

Uso de cannabinoides para el tratamiento de
hemopatías malignas

Mayte Medrano Domínguez

Tesis Doctoral

2023



Uso de cannabinoides para el tratamiento de hemopatías malignas

Esta tesis doctoral ha sido realizada por Mayte Medrano Domínguez en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) para optar al grado de Doctora, dentro del programa oficial de doctorado Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica de la Universidad de Sevilla.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido codirigido por el Prof. José Antonio Pérez Simón y el Dr. Iván Valle Rosado, y financiado con la beca predoctoral PFIS del Instituto de Salud Carlos III (FI16/00412) y FEHH-Janssen 2020 de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), con cargo al proyecto FIS PI14/02074 y PI17/02177 dirigido por el Prof. José Antonio Pérez Simón.

Sevilla, a 24 de abril de 2023

El tutor y director de la tesis,

El co-director de la tesis,

José Antonio Pérez Simón

Iván Valle Rosado

La doctoranda,

Mayte Medrano Domínguez

*"Estoy entre aquellos que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
es un niño colocado ante fenómenos naturales
que lo impresionan como un cuento de hadas."*

Marie Curie

ÍNDICE

Índice

1.	ABREVIATURAS.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	11
2.1.	Hematopoyesis y Hemopatías malignas.....	13
2.1.1.	Hematopoyesis.....	13
2.1.2.	Identificación de progenitores hematopoyéticos.....	14
2.1.3.	Hemopatías malignas.....	17
2.1.3.1.	Mieloma Múltiple (MM).....	18
2.1.3.2.	Leucemia mieloide aguda (LMA).....	19
2.2.	El Sistema endocannabinoide.....	24
2.2.1.	Receptores cannabinoides.....	25
2.2.2.	Agonistas cannabinoides.....	28
2.2.2.1.	Fitocannabinoides.....	28
2.2.2.2.	Endocannabinoides (eCB).....	29
2.2.2.3.	Cannabinoides sintéticos.....	30
2.2.3.	Antagonistas	30
2.2.4.	Mecanismos de acción del receptor CB2	31
2.3.	Uso clínico de los cannabinoides.....	32
2.4.	Metabolismo en hemopatías malignas.....	34
2.4.1.	Ceramidas y esfingolípidos.....	34
2.4.1.1.	Síntesis de ceramidas.....	37
2.4.1.2.	Efecto de los cannabinoides en el metabolismo de ceramidas.....	38
2.4.2.	Metabolismo en LMA.....	39
2.4.2.1.	Glucólisis.....	40
2.4.2.1.1.	Glucólisis en LMA.....	42
2.4.2.2.	Vía de las pentosas fosfatos.....	43
2.4.2.3.	Metabolismo mitocondrial en LMA.....	44
2.4.2.4.	Ciclo de Krebs.....	46

2.5.	<u>Papel de PARP1 y del proceso de poli ADP-ribosilación en la biología celular</u>	
2.5.1.	<u>Funciones de PARP1</u>	47
2.5.1.1.	<u>Reparación del daño en el ADN</u>	47
2.5.1.2.	<u>Regulador mitocondrial</u>	50
2.5.1.3.	<u>Actividad enzimática poli-ADP-Ribosa polimerasa</u>	51
2.5.1.4.	<u>Parthanatos: Muerte mediada por AIF</u>	51
2.5.2.	<u>Inhibidores de PARP: Olaparib</u>	52
3.	<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	55
3.1.	<u>Hipótesis</u>	57
3.2.	<u>Objetivos</u>	57
4.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	59
4.1.	<u>Material biológico</u>	61
4.1.1.	<u>Líneas celulares</u>	61
4.1.1.1.	<u>MM</u>	61
4.1.1.2.	<u>LMA</u>	61
4.1.2.	<u>Muestras humanas sanas</u>	61
4.1.3.	<u>Muestras humanas tumorales</u>	62
4.1.3.1.	<u>Muestras de pacientes con MM</u>	62
4.1.3.2.	<u>Muestras de pacientes con LMA</u>	63
4.1.4.	<u>Animales</u>	64
4.2.	<u>Material no biológico</u>	65
4.2.1.	<u>Tratamientos</u>	65
4.2.2.	<u>Medios y soluciones</u>	65
4.2.3.	<u>Anticuerpos</u>	66
4.2.4.	<u>Kits de actividad enzimática</u>	68
4.2.5.	<u>Programas informáticos</u>	68
4.3.	<u>Métodos</u>	69
4.3.1.	<u>Estudios de viabilidad y apoptosis in vitro</u>	69

4.3.1.1.	<u>Obtención y cultivo de células primarias de pacientes y donantes sanos.....</u>	<u>69</u>
4.3.1.2.	<u>Ensayo de proliferacion "Cell Counting Kit-8 (CCK-8)"</u>	<u>70</u>
4.3.1.2.1.	<u>Líneas celulares.....</u>	<u>70</u>
4.3.1.2.2.	<u>Células sanas.....</u>	<u>71</u>
4.3.1.2.3.	<u>Estudios de sinergismo.....</u>	<u>72</u>
4.3.1.3.	<u>Estudios de viabilidad por FACS.....</u>	<u>72</u>
4.3.1.3.1.	<u>Líneas celulares.....</u>	<u>72</u>
4.3.1.3.2.	<u>Células primarias.....</u>	<u>73</u>
4.3.1.4.	<u>Ensayos clonogénicos a partir de células aisladas.....</u>	<u>76</u>
4.3.2.	<u>Modelos murinos.....</u>	<u>76</u>
4.3.2.1.	<u>Estudio de citotoxicidad en ratones sanos.....</u>	<u>76</u>
4.3.2.1.1.	<u>Análisis de poblaciones en sangre periférica y hematimetría.....</u>	<u>77</u>
4.3.2.1.2.	<u>Análisis de progenitores hematopoyéticos en MO...77</u>	
4.3.2.2.	<u>Modelo murino de MM.....</u>	<u>79</u>
4.3.2.2.1.	<u>Desarrollo del modelo.....</u>	<u>79</u>
4.3.2.2.2.	<u>Monitorización del crecimiento del tumor.....</u>	<u>79</u>
4.3.2.3.	<u>Modelo murino de LMA.....</u>	<u>79</u>
4.3.2.3.1.	<u>Generación de la línea celular HL-60 que sobreexpresa el gen de la luciferasa.....</u>	<u>79</u>
4.3.2.3.2.	<u>Desarrollo del modelo de xenoinjerto murino con HL60.....</u>	<u>80</u>
4.3.2.3.3.	<u>Estudio de la progresión de la enfermedad.....</u>	<u>82</u>
4.3.3.	<u>Extracción de ARN y PCR Cuantitativa (qPCR).....</u>	<u>82</u>
4.3.4.	<u>Microarrays.....</u>	<u>83</u>
4.3.5.	<u>Estudios de expresión de proteínas.....</u>	<u>83</u>
4.3.5.1.	<u>Western blot.....</u>	<u>83</u>
4.3.5.2.	<u>Inmunofluorescencia.....</u>	<u>85</u>
4.3.6.	<u>Estudios de daño mitocondrial.....</u>	<u>86</u>
4.3.6.1.	<u>Análisis del potencial de membrana mitocondrial.....</u>	<u>86</u>

4.3.6.2.	<u>Estudio de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....</u>	<u>86</u>
4.3.7.	<u>Estudios metabólicos.....</u>	<u>87</u>
4.3.7.1.	<u>Cuantificación de ceramidas.....</u>	<u>87</u>
4.3.7.2.	<u>Tasa de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de acidificación extracelular (ECAR).....</u>	<u>88</u>
4.3.7.3.	<u>Actividad enzimática.....</u>	<u>91</u>
4.3.8.	<u>Análisis estadísticos.....</u>	<u>91</u>
4.3.9.	<u>Declaración de ética.....</u>	<u>92</u>
5.	<u>RESULTADOS.....</u>	<u>93</u>
5.1.	<u>Efecto antimieloma de WIN-55.....</u>	<u>95</u>
5.1.1.	<u>WIN-55 disminuye selectivamente la viabilidad de las células de MM.....</u>	<u>95</u>
5.1.2.	<u>El efecto de los cannabinoides está mediado por mecanismos apoptóticos.....</u>	<u>99</u>
5.1.3.	<u>Vías de señalización alteradas por la suplementación de WIN-55 en las células mielomatosas.....</u>	<u>102</u>
5.1.4.	<u>La síntesis de novo de ceramidas está involucrada en la apoptosis inducida por WIN-55.....</u>	<u>103</u>
5.1.5.	<u>Efecto de WIN-55 en el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias.....</u>	<u>105</u>
5.1.6.	<u>El efecto de WIN-55 en las células de MM está mediado por el receptor CB2.....</u>	<u>107</u>
5.1.7.	<u>WIN-55 potencia sinérgicamente el efecto de otros agentes antimieloma.....</u>	<u>108</u>
5.1.8.	<u>La administración de WIN-55 inhibe el crecimiento tumoral in vivo.....</u>	<u>110</u>
5.2.	<u>Efecto antileucémico de WIN-55.....</u>	<u>113</u>
5.2.1.	<u>Las líneas celulares de LMA humanas HL60, KG1a, U937 y MV-4-11 son sensibles a los efectos citotóxicos de WIN-55 pero las células primarias sanas no.....</u>	<u>113</u>
5.2.2.	<u>WIN-55 ejerce un efecto heterogéneo en las células leucémicas primarias de pacientes con LMA.....</u>	<u>116</u>

5.2.3.	<u>Relación entre la sensibilidad a WIN-55 y la expresión de receptores cannabinoides.....</u>	<u>118</u>
5.2.4.	<u>Análisis genético de las mutaciones presentes en blastos de pacientes, y su relación con la sensibilidad a WIN.....</u>	<u>120</u>
5.2.5.	<u>El cannabinoide WIN-55 tiene un potencial antileucémico potente y selectivo in vivo.....</u>	<u>121</u>
5.2.6.	<u>WIN-55 desregula procesos biológicos cruciales en las células de LMA.....</u>	<u>131</u>
5.2.7.	<u>WIN-55 afecta a las principales vías de proliferación e induce apoptosis mediada por caspasas.....</u>	<u>134</u>
5.2.8.	<u>WIN-55 no provoca un daño directo en el ADN, pero PARP1 ejerce un papel importante en el efecto producido por las células de LMA.....</u>	<u>136</u>
5.2.9.	<u>WIN-55 induce daño en organelas como el retículo endoplasmático y la mitocondria.....</u>	<u>139</u>
5.2.10.	<u>La apoptosis inducida por WIN-55 se correlaciona con la acumulación de ceramidas.....</u>	<u>144</u>
5.2.11.	<u>WIN-55 altera las vías metabólicas de las células de LMA.....</u>	<u>151</u>
5.2.12.	<u>WIN-55 promueve la muerte celular a través de PARP (Parthanatos).....</u>	<u>157</u>
6.	<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>159</u>
	<u>Bloque I. Efecto del cannabinoide WIN-55 en mieloma múltiple.....</u>	<u>161</u>
	<u>Bloque II. Efecto del cannabinoide WIN-55 en leucemia mieloblástica aguda....</u>	<u>167</u>
7.	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>183</u>
8.	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>187</u>
9.	<u>ANEXO I.....</u>	<u>211</u>

ABREVIATURAS

1. Abreviaturas

2-AG	2-araquidonilglicerol
2-DG	2-deoxyglucosa
2-HG	2-Hidroxiglutarato
6AN	6-aminonicotinamida
7-AAD	7-aminoactinomicina D
α -KG	α -ketoglutarato
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

A

AA	Antimicina A
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNmt	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
AEA	Anandamida
AIF	Factor de inducción de apoptosis (Apoptosis Inducing Factor)
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (Activated protein kinase)
AraC	Citarabina
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato

B

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B cell lymphoma extra large
BER	Reparación por escisión de bases (Base excision repair)
BSA	Albúmina de suero bovino (Bovine serum albumin)

C

C1P	Ceramida-1-Fosfato
C1PP	Ceramida-1-Fosfato fosfatasa
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2

Abreviaturas

CBD	Cannabidiol
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
Cdc	Célula dendrítica convencional
CEEA	Comité Ético de Experimentación Animal
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CerS	Ceramida sintasa
CI	Combination index
CK	Ceramida kinasa
CLP	Progenitor común linfoide (Common lymphoid progenitor)
CMH	Célula madre hematopoyética
CMP	Progenitor común mielóide (Common myeloid progenitor)
CPM	Célula plasmática mielomatosa
CR	Complete remission o remisión completa
D	
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDR	Respuesta al daño del ADN (DNA damage response)
DES	Dihidroceraida desaturasa
DH-CerS	Dihidroceraida sintasa
dhSph	Dihidroesfingosina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMS	Dimetil succinato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	Rotura de doble cadena del ADN (Double strand DNA breaks)
DSMZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Del alemán, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
E	
ECAR	Tasa de acidificación extracelular (Extracellular acidification rate)
eCB	Endocannabinoide
eCS	Sistema endocannabinoide
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Esclerósis múltiple

Abreviaturas

F

FAAH	Amida hidrolasa de ácido graso
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FB1	Fumonisina B1
FBS	Suero bovino fetal (Fetal bovine serum)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
FLT-3	Receptor de la tirosina kinasa tipo III (Fms related tyrosine kinase 3)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FS	Forward scatter
FCCP	Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone

G

G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCS	Glucosilceramida sintasa
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GFP	Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein)
GLUT1	Transportador de glucosa 1 (glucose transporter 1)
GlyR	Receptor de glicina
GMP	Progenitor granulo-monocítico (Granulocyte-monocyte progenitor)
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GvHD	Enfermedad injerto frente a huésped (Graft versus host disease)

H

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HPC	Célula progenitora hematopoiética (Hematopoietic progenitor cell)
HK	Hexokinasa
HSC	Célula madre hematopoyética (Hematopoietic stem cell)
HR	Recombinación homóloga (Homologous recombination)

I

IDH	Isocitrato dehidrogenasa
IMDM	Medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove
IMiD	Inmunomodulador

Abreviaturas

L

LC-MS-MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas
LD ₅₀	Dosis letal media
Lin	Marcadores de linaje
LK	Lin ⁻ /c-Kit ⁺ /Sca-1 ⁻ cells
LKS	Lin ⁻ /c-Kit ⁺ /Sca-1 ⁺ cells
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LSC	Célula madre leucémica (Leukemic stem cell)
LT-HSC	Célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a largo plazo

M

MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
MEP	Megakaryocyte-erythroid progenitor
MM	Mieloma Múltiple (Multiple Myeloma)
MO	Médula ósea
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MP	Metil Piruvato
MPP	Célula progenitora multipotente (Multipotent progenitor cells)
MS	Espectrometría de masas (Mass spectrometry)
Myr	Miriocina

N

NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAM	Nicotinamida
NAMPT	Nicotinamida Fosforibosiltransferasa
NF-KB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NHEJ	Unión de extremos no homólogos, (Non-homologous DNA end joining)
NMN	Nicotinamida mononucleótido
NSG	NOD scid gamma mouse

Abreviaturas

O

OAA	Ácido oxalacético (Oxalacetic acid)
OCR	Tasa de consumo de oxígeno (Oxygen consumption rate)
OXPHOS	Fosforilación oxidativa (Oxidative phosphorylation)

P

PAR	Poli ADP-ribosa
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7
PFK	Fosfofructoquinasa
PGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PK	Piruvato quinasa
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales (Peroxisome proliferator activated receptors)
PPP	Vía de las pentosas fosfato (Pentose phosphate pathway)
PKA	Proteína quinasa A

R

R5P	Ribulose 5-phosphate
RC	Remisión completa
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
Rot	Rotenona
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

Abreviaturas

S

S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1PP	Esfingosina 1-fosfato fosfatasa
SK	Esfingosina kinasa
SMasa	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sangre periférica
Sph	Esfingomielina
SphK	Esfingomielina quinasa
SPL	Esfingosina-1-fosfato liasa
SPF	Zona libre de patógenos específicos
SPT	Serina C-palmitoiltransferasa
SS	Side scatter
SSB	Single-Stranded DNA Binding Protein
ST-HSC	Célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a corto plazo

T

TBS	Tris buffer salino
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Tricarboxylic acid cycle)
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TMRE	Tetrametilrodamina
TPI	Triosa fosfato isomerasa
TRPV1	Receptor vaniloide tipo I
TTBS	Tris buffer salino-Tween

U

UA	Unidades arbitrarias
UPN	Unique patient number
UPR	Unfolded protein response
URF	Unidades relativas de fluorescencia

Abreviaturas

W

WB	Western blot
WBC	White blood cell
WIN-55	WIN-55 212-2 mesylate
WT	Wild type

Nota: en la mayoría de abreviaturas se ha mantenido la nomenclatura en inglés por ser la de uso habitual

INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1. Hematopoyesis y Hemopatías malignas

2.1.1. Hematopoyesis

El sistema sanguíneo de los mamíferos está constituido por más de diez tipos diferentes de células maduras, como son las células mieloides (monocitos, macrófagos y granulocitos), los linfocitos T y B, los eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, mastocitos, células NK y células dendríticas(Seita & Weissman, 2010).

La hematopoyesis es un proceso que da lugar a los diferentes linajes de células sanguíneas maduras a partir de la diferenciación de células madre hematopoyéticas (en adelante abreviado como HSC, de sus siglas en inglés *Hematopoietic Stem Cell*)(Ng & Alexander, 2017), capaces de repoblar a largo plazo todos los linajes hematopoyéticos cuando son trasplantadas a receptores sometidos a un tratamiento mieloablativo que permita su injerto(Barquinero-Máñez, 2009; Till & McCulloch, 1961). La hematopoyesis se produce principalmente en la médula ósea (MO), aunque en el periodo embrionario y fetal puede darse también en otros órganos como en la región aorta-gónada, mesonefros del mesodermo, el bazo, los ganglios linfáticos o el hígado fetal.

Las HSC se caracterizan por su multipotencialidad y capacidad de auto-renovación y, aunque se han descrito varios modelos de diferenciación, el más aceptado hasta la fecha es el modelo de desarrollo jerárquico, en el cuál las HSC dan lugar progresivamente a progenitores más comprometidos hacia un determinado linaje hematopoyético, finalizando en las células sanguíneas maduras (Figura 1).

Según este modelo, la hematopoyesis comienza con la diferenciación de las HSCs hacia los progenitores multipotenciales (MPP), que no poseen capacidad de automantenimiento, pero sí conservan la capacidad de diferenciación a todos los linajes del sistema hematopoyético.

Los MPPs originan progenitores oligopotentes: el progenitor común linfoide (CLP), del que procede el linaje linfoide, incluyendo linfocitos T, B, células NK y células dendríticas plasmacitoides (pDC); y el CMP (progenitor común mieloide) que origina las células dendríticas convencionales (cDC), el progenitor granulo-monocítico (GMP) y el eritro-megacariocítico (MEP)(Akashi K et al., 2000); de ellos a su vez derivan el linaje granulo-monocítico y el eritro-megacariocítico, respectivamente(Seita & Weissman, 2010).

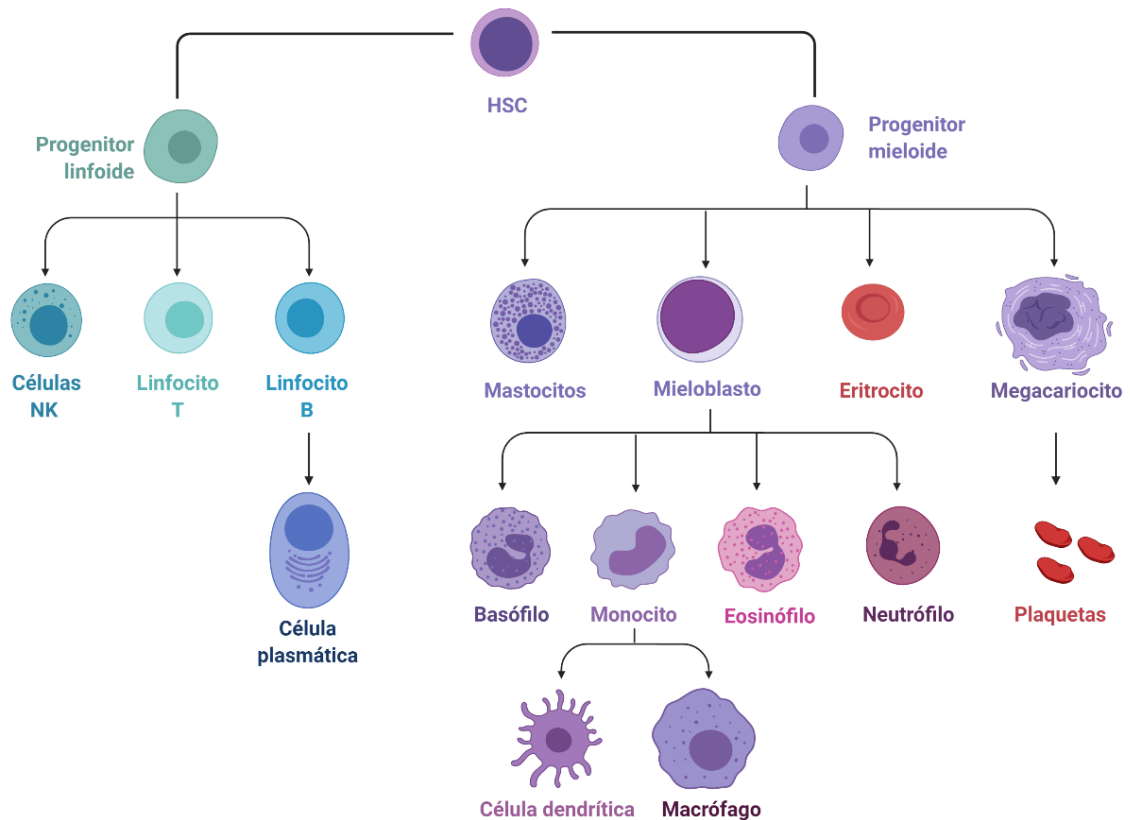


Figura 1. Jerarquía de células hematopoyéticas durante la diferenciación normal de células madre / progenitoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea en células sanguíneas específicas de linaje. (Adaptado de Mahalingaiah et al., 2018)

2.1.2. Identificación de los progenitores hematopoyéticos

Cada uno de los tipos celulares anteriormente mencionados se caracterizan por la expresión de proteínas específicas en su superficie que nos permite su identificación, y esta puede variar dependiendo del organismo del que proceda. En la MO de ratones adultos la expresión diferencial de los marcadores Sca-I, c-Kit, CD150 y CD48 permite el aislamiento de las HSC ($lin^{-}Sca^{+}c\text{-Kit}^{+}CD150^{+}CD48$). Por el contrario, CD150, CD48 y Sca-I no son útiles en humanos, donde las HSC y las células progenitoras hematopoyéticas (HPC) no expresan CD150, y CD48 se expresa tanto en HSC como en HPC. Las HSC humanas a largo plazo se podrían identificar en la fracción $CD34^{+}CD38^{-}lin^{-}$ de la sangre del cordón y la médula ósea (Parekh & Crooks, 2013).

En cuanto a la cantidad de HSC presentes en un organismo, la frecuencia de estas células en la MO es de aproximadamente un 0,01% del total de células nucleadas, pudiéndose aislar aproximadamente 5000 HSC de un único ratón, aunque esta cifra depende de varios factores como su edad, sexo y la cepa, así como del procedimiento de purificación utilizado. Esto limita el estudio de las HSC a técnicas que requieren grandes cantidades de material de partida (Mayle et al., 2013).

El estudio inmunofenotípico por citometría de flujo es esencial para el análisis de las HSC y el diagnóstico, clasificación y monitorización de enfermedades hematopoyéticas clonales, particularmente de neoplasias hematológicas e inmunodeficiencias primarias (Orfao et al., 2019). Weissman y colaboradores describieron en 1988 las primeras pautas para realizar un enriquecimiento de células HSC utilizando la combinación de varios marcadores de superficie (Spangrude et al., 1988). Hoy en día, se han definido marcadores de superficie característicos para cada población. Aunque los avances en este área de conocimiento hacen que vayan actualizándose constantemente las estrategias de identificación, el antígeno CD34 se considera como antígeno universal para la identificación de las HSC humanas (Bonnet, 2002), el cuál disminuye su expresión progresivamente a lo largo de la diferenciación celular, hasta que desaparece en las últimas etapas madurativas (Sutherland & Keating, 1992; Young et al., 1995).

Además, una característica clave que define a las HSC es que no expresan ninguno de los marcadores específicos de los distintos linajes maduros, es decir son Lin⁻.

La población celular de HSC humanas Lin⁻CD34⁺ se puede subdividir en otras usando marcadores como el CD38 y CD45RA, que están ausentes o solo se expresan débilmente en HSC, CD90 (Thy-1), que se expresa en mayor medida en HSC que en células diferenciadas y otros marcadores como el CD133, CD150, c-kit o los receptores de la familia SLAM (Majeti et al., 2007; Maraninchi et al., 1987; Mulford & Jurcic, 2004).

En el caso del ratón, con mucho la especie en la que se han caracterizado mejor los distintos progenitores hematopoyéticos, la identificación de las HSC es algo distinta (por ejemplo, en el ratón las HSC son CD34⁻) (Barquinero-Máñez, 2009; Osawa et al., 1996).

La denominada depleción Lin⁻ utiliza una mezcla de anticuerpos (CD3, CD4 o CD8 para células T, CD11b, CD11c o Gr1 para células mieloides, B220 para células B, o el Ter-119

para células de la serie roja) frente a estos marcadores y permite eliminar la inmensa mayoría de células maduras y de precursores diferenciados, enriqueciendo unas 20 veces en capacidad de repoblación en comparación con la MO no enriquecida en células Lin⁻.

Los antígenos c-Kit y Sca-1 suponen un paso más allá en la identificación de las HSC (Koichi Ikuta et al., 1992). La subpoblación de células Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ (también llamadas L⁻K⁺S⁺ o LKS) engloba todas las células hematopoyéticas multipotentes. Dentro de esta población, podemos identificar otros subgrupos gracias a los marcadores CD34 y Flk-2/Flt3 (Osawa et al., 1996), como son las HSCs con capacidad de reconstitución a largo plazo (LT-HSCs, definidas como L⁻K⁺S⁺ CD34⁻ Flt3⁻), las que presentan capacidad de reconstitución a corto plazo, (ST-HSC, L⁻K⁺S⁺ CD34⁺ Flt3⁻), o los progenitores multipotentes (MPP L⁻K⁺S⁺ CD34⁺ Flt3⁺).

Las LT-HSC son una población muy escasa en la MO, que tiene capacidad de reconstitución a largo plazo (>3-4 meses), mientras que las ST-HSC solo la tienen un corto plazo (en su mayoría <1 mes). Las LT-HSC se diferencian dando lugar a las ST-HSC, y posteriormente, las ST-HSC se diferencian en MPP, que no tienen capacidad de autorrenovación. (Cheng et al., 2020; L. Yang et al., 2005)

La población progenitora mieloide se puede identificar como Lin⁻ c-kit⁺ Scal⁻ (de ahí que se les conozca como células LK) ya que carecen del marcador para el receptor Il7r α . Esta fracción se puede subdividir en progenitores comunes mieloides o CMP (LK CD34⁺ CD16/32⁻), progenitores megacariocíticos-eritroides o MEP (LK CD34⁻ CD16/32⁻) y progenitores granulo-monocíticos o GMP (LK CD34⁺ CD16/32⁺) (Challen et al., 2009)

Por otro lado, los progenitores linfoides comunes o CLP, se pueden identificar en la médula ósea completa usando la combinación de L⁻K⁺S⁺ y el anticuerpo contra el antígeno Il7r α . La población de CLP es bastante escasa, con una frecuencia de ~ 0,02% en la médula ósea de ratón.

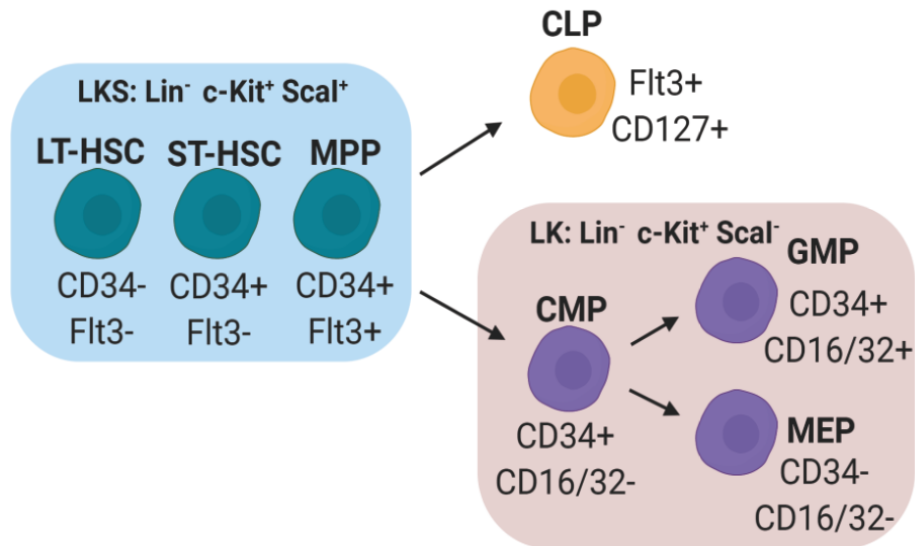


Figura 2. Esquema de los marcadores de superficie para cada subpoblación de HSC en ratón. Se muestran las subpoblaciones L⁻K⁺S⁺ (poblaciones de HSC a largo plazo (LT-HSC), HSC a corto plazo (ST-HSC) y progenitor multipotente (MPP)), subpoblaciones de L⁻K⁺ (progenitor mielocítico común (CMP), progenitores de megacariocitos / eritrocitos (MEP) y Poblaciones de progenitores de granulocitos / macrófagos (GMP) y CLP (progenitor linfocítico común).

En la actualidad, la información inmunofenotípica se complementa con la identificación de genes que regulan el desarrollo, la autorrenovación y la diferenciación de las HSC, como son los estudios de célula única ó "*single cell*" y modelos genéticos de ratón (Cheng et al., 2020). El conocimiento de los genes, las interacciones proteicas, y las vías regulatorias que sustentan la biología de las HSC será de vital importancia en los próximos años para la comprensión de la hematopoyesis normal y patológica (Papathanasiou et al., 2010).

2.1.3. Hemopatías malignas

Las hemopatías malignas son trastornos clonales que conducen a la transformación tumoral de las células de estirpe hematopoyética y que pueden producirse en los distintos estadios madurativos a lo largo de su proceso de diferenciación. Determinar la composición de los tipos de células que constituyen las subpoblaciones de HSC humanas y la relación entre ellos puede ayudar tanto a identificar los factores celulares y moleculares que intervienen en el desarrollo normal y leucémico de las células madre

como a avanzar en las aplicaciones clínicas de trasplantes, terapia génica, expansión de células madre y eliminación de células tumorales(Bonnet, 2002). El análisis genómico ha influido en el diagnóstico y el tratamiento de las neoplasias hematológicas.(Taylor et al., 2017)

En el trabajo de la presente tesis doctoral, nos centramos en el mieloma múltiple, cuyo evento clonal afecta a la estirpe linfoide en su último estadio de diferenciación, y en la leucemia aguda mieloblástica, que afecta a las células más inmaduras de estirpe mieloide. Estas patologías, a pesar de afectar a células en extremos opuestos del proceso de diferenciación, comparten una característica común como mostraremos a continuación: su sensibilidad al efecto pro-apoptótico de los derivados cannabinoides.

2.1.3.1. Mieloma Múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una hemopatía maligna que se define por la presencia de células plasmáticas monoclonales que producen una paraproteína monoclonal, dando lugar a algunas manifestaciones clínicas características como anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia o lesiones óseas (síntomas conocidos como "CRAB")(García-sanz et al., 2007; Rajkumar et al., 2014) . En el momento del diagnóstico, el síntoma clínico prevalente es anemia normocrómica-normocítica, presente en ~75% de los pacientes, mientras que la leucopenia y la trombocitopenia se encuentran con menos frecuencia(Bruns et al., 2012; Kyle et al., 2003).

En cuanto a su incidencia, es la segunda neoplasia maligna hematológica más frecuente (aproximadamente el 10%), y representa el 1% de todos los cánceres, causando el 2% de las muertes por cáncer(Laubach et al., 2010; Rajkumar et al., 2014). La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico es de unos 65 años.(Rajkumar, 2018)

Los pacientes con MM presentan una reducción significativa de células progenitoras en la MO, en particular de MEP, los cuáles presentan alteraciones funcionales con respecto a su capacidad clonogénica y de autorrenovación a largo plazo, así como su actividad proliferativa. Por lo tanto, el agotamiento de las HSC en la MO de pacientes con MM no solo se debe a un desplazamiento poblacional, sino que también resulta de un deterioro funcional(Bruns et al., 2012).

La célula plasmática maligna surge de una célula B madura que ha pasado por el centro germinal del folículo linfóide y ha sufrido el proceso de hipermutación somática, (Tripodo et al., 2011). Respecto a la expresión de antígenos celulares estudiados mediante citometría de flujo, a diferencia de la célula plasmática normal (CD38⁺ high, CD19⁺ y CD56⁻), el fenotipo de la célula plasmática mielomatosa es IgS⁻, IgC⁺, CD38⁺ low, CD138⁺ (Syndecan-1), CD19⁻, CD56⁺ (San Miguel et al., 1995)

Durante muchos años, el melfalán y la prednisona han representado el estándar en la terapia del MM, seguidos de trasplante de células madre hematopoyéticas (Laubach et al., 2010). En los últimos años, las mejoras terapéuticas aportadas por fármacos inmunomoduladores (IMiDs del inglés "*Immunomodulatory Drugs*", como la talidomida, lenalidomida y pomalidomida), inhibidores del proteasoma (como bortezomib, carfilzomib e ixazomib), y el avance de la inmunoterapia con la generación de nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos (como elotuzumab y daratumumab), han permitido un progreso notable en el control de esta enfermedad, aumentándose el tiempo medio de supervivencia de 3 a 9 años. Sin embargo, todavía se considera incurable (K. C. Anderson & Carrasco, 2011; Shah et al., 2020). Por lo tanto, se están dedicando grandes esfuerzos a descubrir nuevos fármacos con el fin de mejorar el arsenal terapéutico actualmente disponible.

2.1.3.2. Leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) es causada por un trastorno clonal en las células madre hematopoyéticas del linaje mieloide. (Büchner et al., 2009; Estey et al., 2006).

La LMA se caracteriza por la aparición de aberraciones cromosómicas recurrentes y mutaciones, que se pueden agrupar en 8 grandes grupos de acuerdo a la clasificación propuesta por Döhner et al, 2015 (Figura 3):

- Mutaciones en genes de señalización, como el gen del receptor de la tirosina quinasa de clase III (FLT-3), que confieren una ventaja proliferativa a través de la vía de señalización RAS-RAF, JAK-STAT y PI3K-AKT.
- Mutaciones en factores de transcripción mieloides como RUNX1 y fusiones de factores de transcripción por reordenamientos cromosómicos, como la

traslocación t(8; 21) (q22; q22); RUNX1-RUNX1T1, que conducen a la desregulación transcripcional y diferenciación hematopoyética alterada.

- Mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1), que codifica una proteína de transporte nucleocitoplasmático multifuncional, que dan como resultado la localización citoplasmática aberrante de NPM1 y de las proteínas que interactúan con NPM1.
- Mutaciones en genes del complejo del espliceosoma como SRSF2, SF3B1, U2AF1 y ZRSR2, que están involucradas en el procesamiento desregulado de ARN.
- Mutaciones en genes del complejo de cohesina, como STAG2 y RAD21, que pueden afectar a la segregación cromosómica precisa y a la regulación transcripcional.
- Mutaciones en genes implicados en la homeostasis epigenética de las células, como las descritas en ASXL1 o en EZH2, que conducen a la desregulación de la modificación de la cromatina (p. Ej., Metilación de las histonas H3 y H2A en los residuos de lisina K79, K27, y K119, respectivamente), así como la fusión del gen KMT2A-MLLT3, que puede dañar otras transferasas de grupos metilo como DOT1L (DOT1-like histona H3K79 metiltransferasa).
- Mutaciones en DNMT3A y TET2, así como mutaciones en IDH1 e IDH2, actuando a través de la producción del oncometabolito 2-hidroxiglutarato (2-HG), que puede conducir a la desregulación de la metilación de las regiones del ADN que contienen 5-metilcitosina (5mdC) y su producto de desmetilación 5-hidroximetilcitosina (5hmdC).
- Mutaciones en genes supresores de tumores como TP53, las cuales pueden conducir a la desregulación y posterior degradación a través de MDM2 y PTEN.

Esta heterogeneidad de las LMA plantea un gran desafío terapéutico(J. Chen et al., 2010)

Para el diagnóstico de la LMA se emplean diferentes técnicas, como el estudio morfológico, el inmunofenotipado, y los estudios genéticos y moleculares(Döhner et al., 2010; Löwenberg et al., 2003).

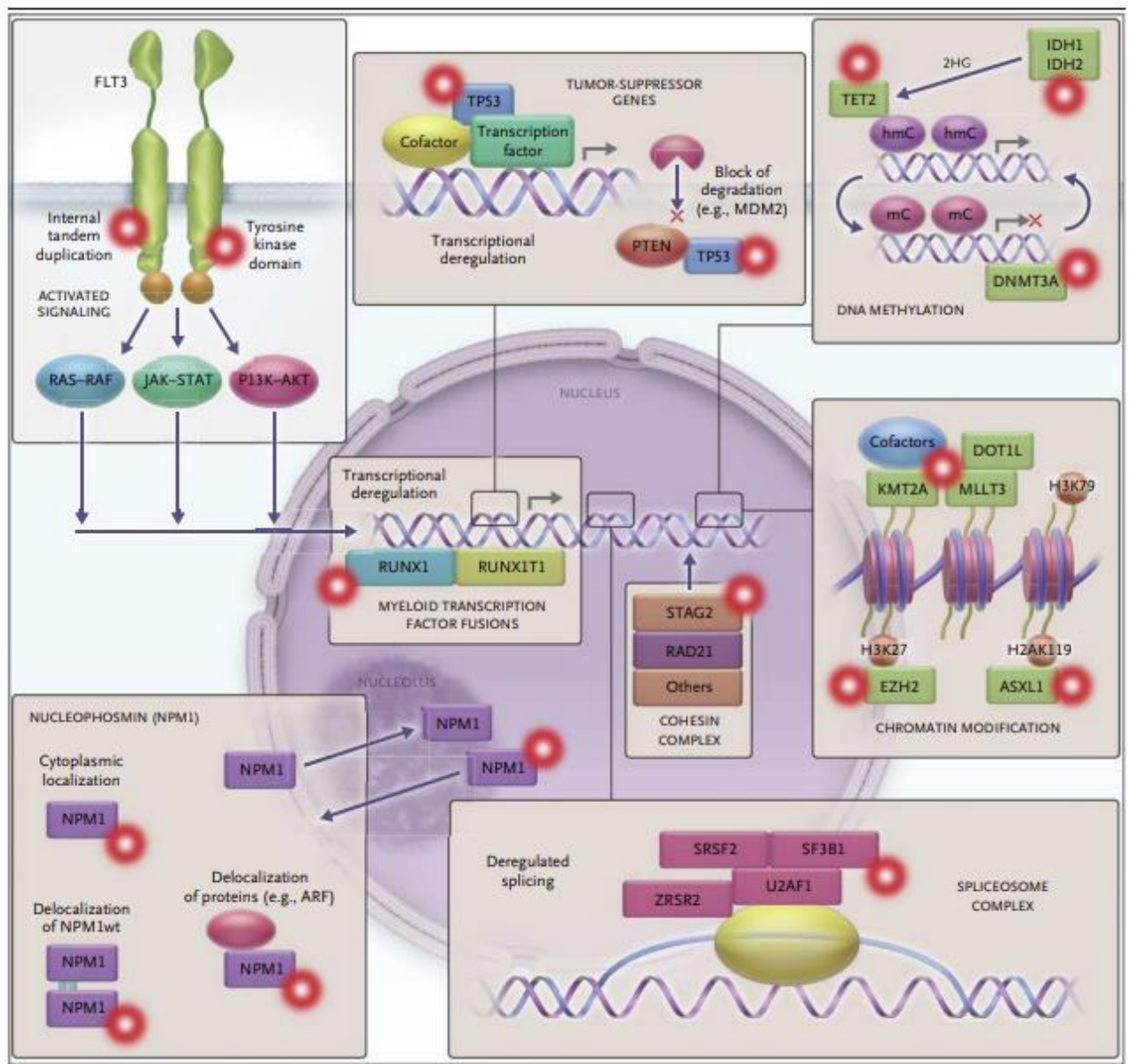


Figura 3. Clasificación de los distintos grupos de LMA según las aberraciones cromosómicas recurrentes y mutaciones propuesta por Döhner (NEJM 2015).

La identificación de la LMA por citometría de flujo es compleja debido a la heterogeneidad de pacientes y subtipos de la enfermedad. Los marcadores aceptados para la identificación de cada subtipo, junto con otros criterios de diagnóstico que han sido aceptados recientemente aparecen en la Tabla 1.(Arber et al., 2022; Khoury et al., 2022)

TIPOS	CRITERIO DE DIAGNÓSTICO
LMA con diferenciación mínima	<ul style="list-style-type: none"> • Los blastos son negativos (<3%) para MPO y SBB por citoquímica • Expresión de 2 o más antígenos asociados a mieloides, como CD13, CD33 y CD117
LMA sin maduración	<ul style="list-style-type: none"> • ≥3% de blastos positivos para MPO (por inmunofenotipado o citoquímica) o SBB y negativos para NSE por citoquímica • Las células en maduración del linaje granulocítico constituyen <10% de las células nucleadas de la MO • Expresión de dos o más antígenos asociados a mieloides, como MPO, CD13, CD33 y CD117
LMA con maduración	<ul style="list-style-type: none"> • ≥3% de blastos positivos para MPO (por inmunofenotipificación o citoquímica) o SBB por citoquímica • Las células en maduración del linaje granulocítico constituyen ≥10 % de las células nucleadas de la MO • Las células de linaje de monocitos constituyen <20 % de las células de la médula ósea • Expresión de dos o más antígenos asociados a mieloides, como MPO, CD13, CD33 y CD117
Leucemia basófila aguda	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos y basófilos inmaduros/maduros con metacromasia en la tinción con azul de toluidina • Los blastos son negativos para MPO, SBB y NSE citoquímicos • Sin expresión del equivalente fuerte de CD117 (para excluir la leucemia de mastocitos)
Leucemia mielomonocítica aguda	<ul style="list-style-type: none"> • ≥20 % de monocitos y sus precursores • ≥20 % de células granulocíticas en maduración • ≥3 % de blastos positivos para MPO (mediante inmunofenotipificación o citoquímica)
Leucemia monocítica aguda	<ul style="list-style-type: none"> • ≥80 % de monocitos y/o sus precursores (monoblastos y/o promonocitos) • <20 % de células granulocíticas en maduración • Blastos y promonocitos que expresan al menos dos marcadores monocíticos, incluidos CD11c, CD14, CD36 y CD64, o positividad de NSE en citoquímica
Leucemia eritroide aguda	<ul style="list-style-type: none"> • ≥30 % de células eritroides inmaduras (proeritroblastos) • Médula ósea con predominio eritroide, por lo general ≥80% de la celularidad
Leucemia megacarioblástica aguda	<ul style="list-style-type: none"> • Los blastos expresan al menos una o más de las glicoproteínas plaquetarias: CD41 (glicoproteína IIb), CD61 (glicoproteína IIIa), o CD42b (glicoproteína Ib)

Tabla 1. Expresión de marcadores citoplasmáticos y de superficie celular para el diagnóstico de LMA.

*Los criterios de diagnóstico compartidos incluyen:

- ≥20% de blastos en médula ósea y/o sangre (excepto leucemia eritroide aguda).
- No se cumplen criterios para tipos de LMA con alteraciones genéticas definidas.

- No se cumplen los criterios para la leucemia aguda de fenotipo mixto (relevante para la LMA con diferenciación mínima).
- No cumplir con los criterios de diagnóstico de neoplasia mielode post terapia citotóxica.
- Sin antecedentes de neoplasia mieloproliferativa.

MO (médula ósea), MPO (mieloperoxidasa), NSE (esterasa no específica), SBB (Sudan Black B). (Adaptado de Khoury et al, 2022).

En cuanto al pronóstico, solo el 40-55% de los adultos mayores de 60 años logran una remisión completa (RC), con pésimas tasas de supervivencia a largo plazo(Shiple & Butera, 2009). Entre los pacientes más jóvenes, el 60-80% logra la RC con la terapia estándar(Löwenberg et al., 2003). Sin embargo, solo el 20-30% tiene una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo(Tallman et al., 2005).

En la última década, las opciones de tratamiento para la LMA se han expandido como resultado del descubrimiento de nuevas dianas moleculares, pero la mayoría de ellos se encuentran aún en fase de ensayo clínico(DiNardo & Wei, 2020; Kayser & Levis, 2018).

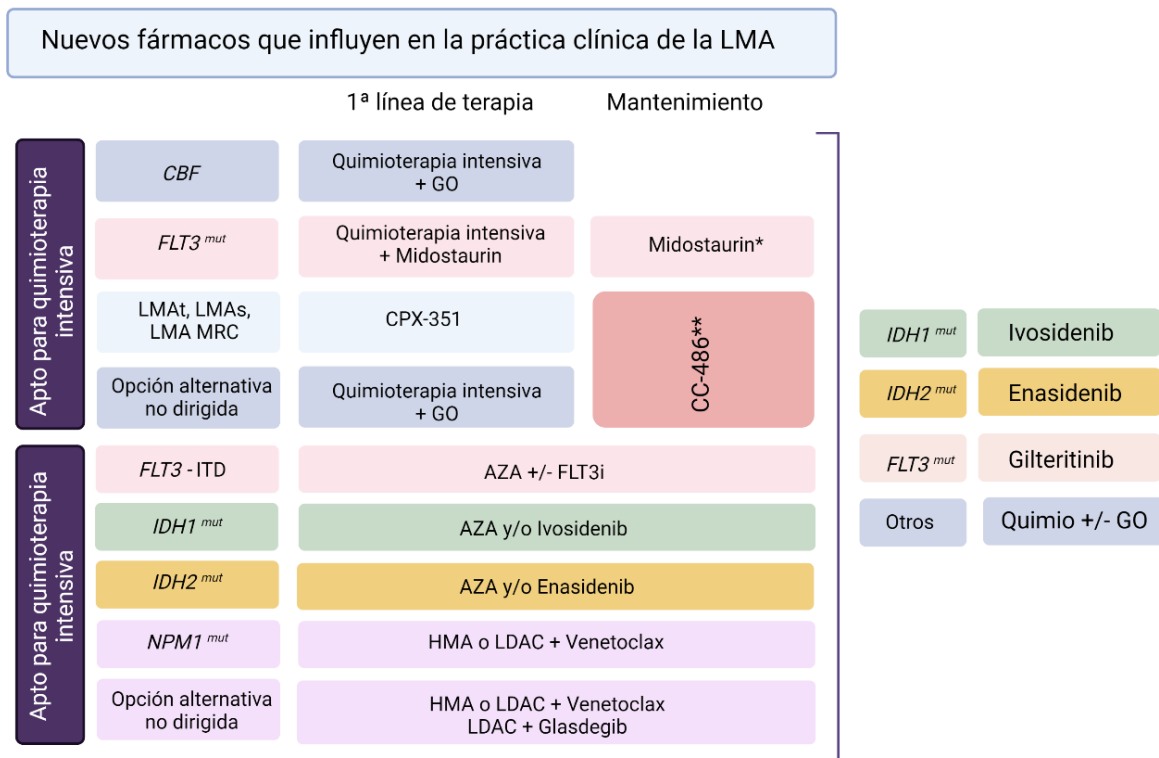


Figura 4. Resumen de los nuevos fármacos usados en la práctica clínica de la LMA.

Para los pacientes sin comorbilidades en ausencia de una diana terapéutica, CPX-351 puede ser la opción preferida para la terapia en pacientes con LMA con displasia y gemtuzumab ozogomicina (GO) podrían añadirse a la terapia convencional, especialmente para pacientes con LMA con factor de unión al núcleo (CBF). Para los pacientes que no son aptos para la quimioterapia intensiva, es probable que las opciones de tratamiento dirigido y no dirigido se utilicen más ampliamente en el futuro en combinación con Ara-C en dosis bajas (LDAC) o agentes hipometilantes (HMA). (Adaptado de Di Nardo & Wei, Blood 2020)

La identificación de dianas terapéuticas es una tarea de rutina tanto en el momento del diagnóstico como durante la progresión de la enfermedad. Como se describe en la figura 4, se debe considerar a los pacientes por su idoneidad para la terapia intensiva frente a la no intensiva. (DiNardo & Wei, 2020).

A pesar de estos avances, para la gran mayoría de pacientes, el régimen de inducción estándar se basa en la combinación de un agente específico del ciclo celular, como es la citarabina 100 mg / m² en infusión continua durante 7 días y una antraciclina, como la daunorrubicina a concentraciones que van desde 45 a 60 mg/m²/d por vía intravenosa durante 3 días, régimen que se lleva usando desde hace más de 40 años (Crowther et al., 1970; Dillman et al., 1991; Tallman et al., 2005; Yates et al., 1982).

Por tanto, la identificación de nuevos compuestos activos en el tratamiento de esta enfermedad es, al igual que en el mieloma múltiple, una necesidad médica insatisfecha.

2.2. El Sistema endocannabinoide

Los cannabinoides son componentes activos de la planta *Cannabis sativa* (marihuana) y sus derivados.

El interés terapéutico sobre los cannabinoides surgió después del descubrimiento de un complejo sistema endocannabinoide (eCS) en humanos (Mackie, 2008; Onaivi, 2008), el cual está constituido por ligandos endógenos (endocannabinoides), junto con sus receptores y las proteínas responsables de su síntesis, transporte y degradación (Mackie, 2008; Malfitano et al., 2014; Velasco et al., 2012)

2.2.1. Receptores cannabinoides

Hasta la fecha, se han identificado dos tipos de receptores cannabinoides específicos, el receptor CB1, clonado a partir de muestra de cerebro de rata en 1990(Matsuda et al., 1990), y el receptor CB2, obtenido a partir de la línea celular de leucemia promielocítica humana HL60, en 1993(Munro et al., 1993a). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (Howlett, 2002)(Howlett, 2002; Pertwee et al., 2010).

Los receptores CB1 se encuentran mayoritariamente en el cerebro y el sistema nervioso central, y en menor abundancia en sistema nervioso periférico y órganos(Mackie, 2008). Está implicado en la capacidad de reconocimiento y memoria, además del control de la función motora. Estos receptores también median muchos de los efectos psicoactivos de los cannabinoides(Mackie, 2008).

Por otro lado, los receptores CB2 se encuentran principalmente en órganos periféricos, especialmente en células del sistema inmune y hematopoyético (Galiegue et al., 1995), que también expresan CB1 aunque en mucha menor medida(Howlett, 2002). Estudios de expresión génica del gen *Cnr2* (gen que codifica para el receptor CB2) han revelado que se expresa en todas las células hematopoyéticas, pero sus niveles de expresión varían entre las poblaciones de células inmunes, al igual que en sus estados de activación o reposo. En los seres humanos, los niveles de expresión de *Cnr2* entre las poblaciones de células inmunitarias es el siguiente: células B> células NK> macrófagos> células polimorfonucleares> células T CD8> células T CD4(Galiegue et al., 1995).

Las funciones de los receptores cannabinoides incluyen la modulación de la liberación de citocinas, la migración de células inmunes y la estimulación del crecimiento en la mayoría de los linajes hematopoyéticos(Derocq et al., 2000; P. Valk et al., 1997).

Se ha descrito que los receptores CB2 desempeñan diferentes funciones en el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. En macrófagos, la estimulación de CB2 suprime la proliferación y la liberación de citocinas IL-2, IL-12 y TNF- α , a la vez que induce la migración de células NK y suprime la migración y diferenciación de neutrófilos.

Modelos murinos deficientes en CB2 muestran que la hematopoyesis en ratones CB2^{-/-} parece ser completamente normal, a excepción de una linfocitosis leve y niveles ligeramente elevados de células progenitoras circulantes. Además, la movilización en

respuesta a estímulos farmacológicos (como Plerixafor o G-CSF), es indistinguible entre ratones silvestres y *Cnr2*^{-/-} y, en experimentos de trasplante en animales receptores irradiados las células de MO de animales *Cnr2*^{-/-} reconstituyen la hematopoyesis con una cinética similar a las células silvestres (Danner et al., 2019).

Estructuralmente, el receptor CB2 está compuesto por una cadena polipeptídica, que contiene siete hélices- α transmembrana, con un extremo amino-terminal (NH₂) extracelular y glicosilado, y un extremo carboxi-terminal (COOH) intracelular (Malfitano et al., 2014). El estado de fosforilación de CB2 se puede determinar mediante el uso de un anticuerpo policlonal específico que reconoce el COOH-terminal y que puede discriminar entre las isoformas de CB2 fosforiladas activas (fosforiladas en la serina 352) e inactivas (no fosforiladas en este residuo) (BOUABOULA et al., 1993; Galiegue et al., 1995; Malfitano et al., 2014).

Además de activar los receptores CB1 y CB2, los cannabinoides también interactúan con otros receptores GPCR y canales iónicos. Algunos de ellos son:

- Receptor vanilloide tipo 1 o TRPV1: Son canales catiónicos no selectivos que conducen el calcio y el sodio a una amplia variedad de tipos celulares en los mamíferos (Starkus et al., 2019). Están presentes en sangre, MO, lengua, riñones, hígado, estómago, vías respiratorias y neuronas, donde desempeñan un papel en la nocicepción debido a su capacidad de respuesta a nivel molecular a los metabolitos secundarios de las plantas que son nocimiméticos (p. Ej., Capsaicina) y a compuestos que son picantes e imitan sensaciones de ardor o enfriamiento (p. Ej., alicina, cinamaldehído, mentol). Algunos cannabinoides, incluidos la anandamida (AEA), Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) y algunos compuestos minoritarios del Cannabis se unen a este receptor (Pertwee et al., 2010; Starkus et al., 2019). La activación cannabinoide de TRPV1 muestra una dependencia significativa de niveles externos de calcio. Otros canales de esta familia, como el TRPV2, TRPM8 y TRPA1 también muestran una activación diferencial con la exposición a cannabinoides. (Starkus et al., 2019)
- GPR18: Es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) que comparte una homología de secuencia baja con los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (~13%

y 8% respectivamente). No obstante, se ha relacionado con el sistema endocannabinoide, ya que se ha demostrado que una variedad de cannabinoides endógenos, fitogénicos y sintéticos modulan este receptor. Se puede encontrar principalmente en la MO, el bazo y los ganglios linfáticos y, en menor medida, los testículos (Console-Bram et al., 2014; Morales et al., 2020; Pertwee et al., 2010).

En los últimos años se ha demostrado el potencial terapéutico de GPR18, ya que la modulación de este receptor se ha asociado con procesos fisiopatológicos que incluyen dolor, fisiología del esperma, inmunomodulación, presión intraocular, metabolismo o cáncer (Morales et al., 2020)

- GPR55: Otro receptor GPCR con capacidad de interactuar y ser modulado por ligandos cannabinoides, y que está altamente expresado en huesos, el yeyuno e íleon y el cerebro, en particular el cerebelo.

En neuronas puede activarse por varios cannabinoides (THC, metanandamida, JWH-015, CP55940, AEA y 2-araquidonilglicerol (2-AG)) (Mackie, 2008), aumentando el calcio intracelular e iniciando vías de señalización distintas a las que se activan por los receptores CB1 y CB2 (Lauckner et al., 2008; Pertwee et al., 2010; Ryberg et al., 2007).

- Receptores PPAR: Algunos cannabinoides activan las diferentes isoformas de los receptores PPAR (α , β y γ). La superfamilia PPAR participa en el metabolismo de los lípidos intracelulares mediante la regulación transcripcional de genes implicados en la captación, transporte y almacenamiento de lípidos en adipocitos, monocitos y macrófagos (Luo et al., 2020). La activación de todas las isoformas, pero principalmente PPAR α y γ , media algunos (pero no todos) de los efectos analgésicos, neuroprotectores, de modulación de la función neuronal, antiinflamatorios, metabólicos, antitumorales, gastrointestinales y cardiovasculares de algunos cannabinoides, a menudo junto con activación de los sitios de acción diana más tradicionales, como los receptores cannabinoides CB1 y CB2 y el canal iónico TRPV1. Los PPAR también median algunos de los efectos de los inhibidores de la degradación o el transporte de endocannabinoides (O'Sullivan, 2016). Algunos endocannabinoides como la AEA

y la 2-AG se unen a receptores activados por proliferadores de peroxisomas(Malfitano et al., 2014).

- Receptores de glicina (GlyR): El canal de cloruro del receptor de glicina (GlyR) es un miembro de la familia de canales iónicos activados por ligandos del receptor nicotínico de acetilcolina. El GlyR es más conocido por mediar la neurotransmisión inhibitoria en la médula espinal y el tronco encefálico, aunque también puede tener otras funciones fisiológicas, incluida la neurotransmisión excitadora en neuronas embrionarias(Lynch, 2004). Los receptores inhibidores de glicina son una diana importante para los cannabinoides en los sistemas nerviosos central y periférico. El THC y otros cannabinoides pueden aumentar la actividad de los GlyR a través de un mecanismo independiente de CB1 y CB2. El THC y los GlyR comparten funciones similares en la regulación de algunos comportamientos, como la actividad neuromotora, la sensación de dolor, la relajación muscular y la ansiedad(Hejazi et al., 2006; Pertwee et al., 2010; Xiong et al., 2011).

2.2.2. Agonistas cannabinoides

Dependiendo de la procedencia de los cannabinoides pueden clasificarse en fitocannabinoides, endocannabinoides y cannabinoides sintéticos:

2.2.2.1. Fitocannabinoides

La planta *Cannabis sativa L.* (marihuana) se ha utilizado durante muchos siglos tanto con fines medicinales como recreativos. Hoy en día, es ampliamente aceptado que, de los ~70 cannabinoides producidos por la marihuana, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol o THC, es el más relevante debido a su alta potencia y abundancia en preparaciones vegetales (Velasco et al., 2012). Aunque los fitocannabinoides tienen estructuras químicas similares, sus efectos farmacológicos pueden ser muy diferentes(Malfitano et al., 2014).

El THC fue el primer componente psicoactivo del cannabis que se identificó(Mechoulam & Gaoni, 1967) y actúa como agonista parcial del receptor cannabinoide CB1 (Malyshevskaya et al., 2017).

El cannabidiol o CBD es el segundo compuesto principal de la planta, y es de particular interés ya que no es psicoactivo y no afecta la función locomotora, la temperatura corporal o la memoria por sí solo. Sin embargo, se ha sugerido que dosis elevadas de CBD mejoraban los efectos farmacológicos del THC a través de un mecanismo dependiente de CB1.

Este cannabinoide tiene una afinidad muy baja por los receptores CB1 y CB2 (algunos los consideran un agonista inverso de CB2(Thomas et al., 2007))(Hahn, 2017).

2.2.2.2. Endocannabinoides (eCB)

Después del descubrimiento de los receptores cannabinoideos, los estudios revelaron que los tejidos de los mamíferos podían sintetizar agonistas del receptor cannabinoide y liberarlos para ejercer diferentes funciones fisiológicas(Pertwee et al., 2010).

Los endocannabinoides mejor estudiados son los lípidos a base de araquidonato. La N-araquidonoil etanolamina (también conocida como anandamida o AEA) fue el primer eCB descrito(Mechoulam et al., 1995), y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) el segundo identificado (Mackie, 2008).

Aunque la anandamida puede actuar como un agonista parcial a través de los receptores CB1 y CB2 (con mucha más afinidad para el primero), también es un antagonista del receptor TRPV1 y algunos de sus metabolitos pueden presentar, además, otros mecanismos de acción importantes(Pertwee & Ross, 2002).

La AEA y el 2-AG pueden servir como neurotransmisores o neuromoduladores, ya que hay evidencias de que son sintetizados por neuronas "a demanda", que pueden controlarse mediante liberación inducida por la despolarización de las neuronas y que una vez liberados se eliminan rápidamente del espacio extracelular por un proceso de transporte de membrana(Di Marzo, 1999; Di Marzo et al., 1998; Pertwee & Ross, 2002) .

La AEA es degradada por la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH) a ácido araquidónico y etanolamina y el 2-AG es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) a ácido araquidónico y glicerol.(Fonseca et al., 2013; Malfitano et al., 2014)

2.2.2.3. Cannabinoides sintéticos

Hasta principios de los noventa, todos los compuestos conocidos por actuar como cannabimiméticos fueron estructuralmente derivados del THC. La situación cambió cuando los investigadores de la farmacéutica Sterling Winthrop describieron una nueva familia de aminoalquilindoles que poseían propiedades cannabimiméticas. R-(+)-WIN55-212 es el compuesto de la serie más estudiado, disponible comercialmente. Muestra una alta afinidad por ambos receptores cannabinoides, con selectividad moderada a favor del receptor CB2. (Bouaboula et al., 1997; Griffin et al., 1998; Tao y Abood, 1998; Pertwee, 1999). In vivo, produce el espectro de efectos farmacológicos del THC y sustitutos, mientras que su enantiómero S-(-)-WIN55-212-3, carece de actividad tanto *in vivo* como *in vitro* (Martin et al., 1991; Compton et al., 1992a; Pacheco et al., 1993; Slipetz y col., 1995; Wiley y col., 1995b; Pertwee, 1997; Pertwee, 1999). (Howlett, 2002). Esto se debe a que los agonistas de receptores cannabinoides a menudo contienen centros quirales y estos generalmente confieren una marcada estereoselectividad en ensayos farmacológicos. (Pertwee, 2006)

2.2.3. Antagonistas

Los posibles usos terapéuticos de los antagonistas de receptores cannabinoides incluyen el manejo de esclerosis múltiple / lesión de la médula espinal, dolor, trastornos inflamatorios, glaucoma, asma bronquial, vasodilatación que acompaña cirrosis avanzada y cáncer (Pertwee & Ross, 2002). De estos, SR141716A y LY320135 exhiben una selectividad significativa por CB1, mientras que SR144528 y AM630, que son compuestos selectivos de CB2, también se comportan como agonistas inversos en lugar de antagonistas "silenciosos" (Pertwee & Ross, 2002). Mientras que las dianas terapéuticas para los agonistas inversos / antagonistas del receptor CB2 siguen siendo identificadas o validadas, es probable que el agonista inverso / antagonista del receptor CB1, SR141716A (Rimonabant / Acomplia), se ha diseñado para su uso en clínica como agente contra la obesidad (Pertwee, 2006).

2.2.4. Mecanismos de acción del receptor CB2

El receptor CB2 suele estar acoplado a una proteína G_i / G_{α} que desencadena una vía de señalización canónica que conduce a la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa y la reducción de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La falta de AMPc atenúa la activación de la proteína quinasa A (PKA). Dado que la PKA activada fosforila factores de transcripción que regulan genes que promueven la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células inmunes; el resultado final es la inhibición inmunitaria.

La señalización de CB2 a través de las subunidades $G_{\beta\gamma}$ también se produce y está acoplada a la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La señalización de MAPK desempeña un papel importante en la migración celular, la producción de citocinas, la proliferación y la apoptosis. Hay tres MAPK principales que se han encontrado reguladas por CB2, que son proteína quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), p38 MAPK y quinasas c-Jun NH₂-terminales (JNK)(Malfitano et al., 2014).

Entre las moléculas principales que regulan la muerte celular inducida por cannabinoides están las ceramidas, las especies reactivas de oxígeno (ROS), las quinasas mitogénicas (MAPK) y algunos factores de supervivencia.

Los cannabinoides pueden modular también las vías de metabolización de los esfingolípidos al inducir la degradación de la esfingomielina y aumentar los niveles de ceramida. Esta estimulación de la síntesis de ceramidas a través de la activación de la serina palmitoiltransferasa (SPT) aumenta los niveles de p8, una proteína regulada por el estrés que también regula a genes relacionados con estrés del retículo endoplásmico (RE) como ATF-4, CHOP y TRB3, lo que conduce a la inducción posterior de apoptosis.(Sarfaraz et al., 2008)

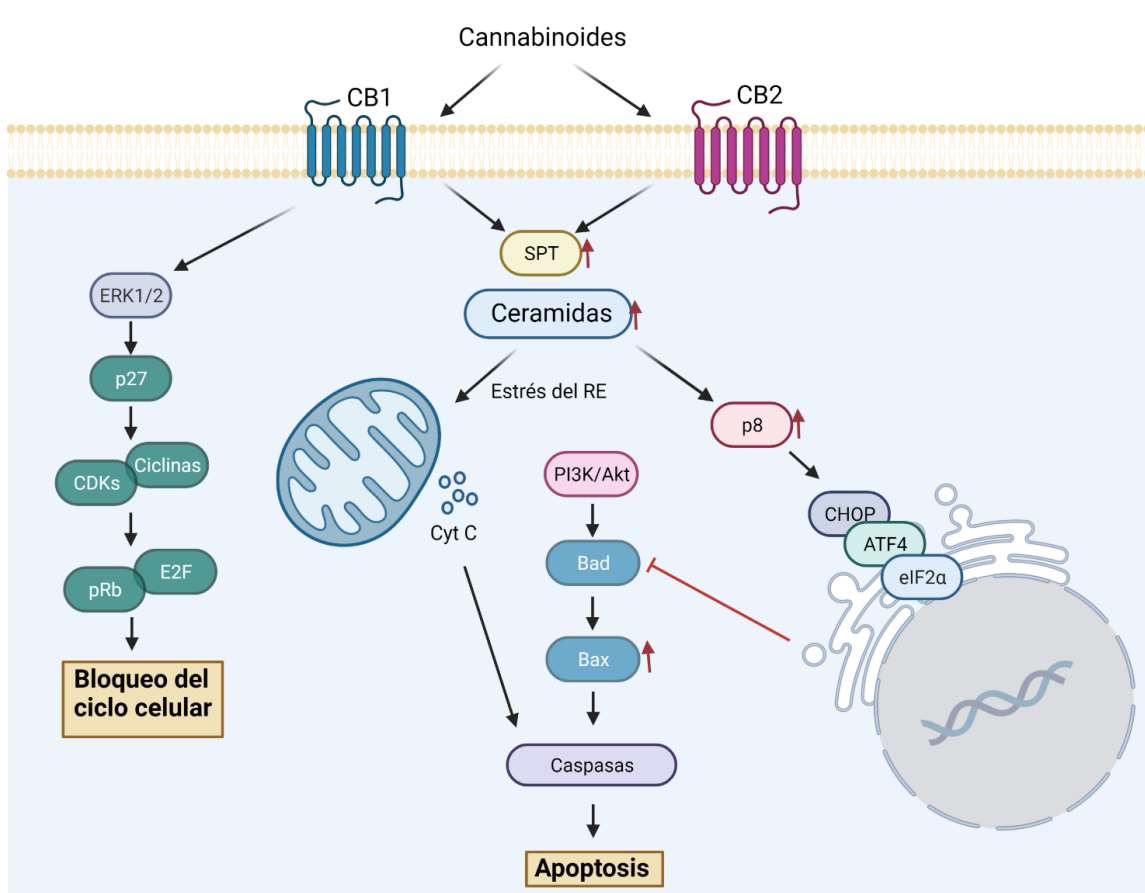


Figura 5. Representación esquemática de las vías de señalización asociadas con la activación del receptor cannabinoide inducida por sus agonistas. Tras la unión al receptor, los agonistas del receptor cannabinoide inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la proteína quinasa dependiente de AMPc, que activa las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK). La estimulación de la síntesis de ceramidas a través de la activación de la serina palmitoiltransferasa (SPT) regula al alza p8, lo que conduce a la inducción posterior de apoptosis. Los agonistas del receptor de cannabinoides también activan las vías MAPK y PI3K/Akt. La activación sostenida de ERK1/2 conduce a la inducción del inhibidor de ciclina quinasa p27/KIP1 con modulación de moléculas reguladoras del ciclo celular, lo que da como resultado la detención de G1 y apoptosis. Los mecanismos propuestos se basan en la literatura disponible y son específicos de cada célula, y no todas las vías se activan simultáneamente. Se necesitan más estudios para desentrañar el mecanismo de acción detallado de la activación del receptor de cannabinoides por parte de sus agonistas. (Adaptado de Sarfaraz et al., 2008)

2.3. Uso clínico de los cannabinoides

Los cannabinoides están implicados en la regulación de diversas funciones fisiológicas, como la nocicepción, la transmisión sináptica o la homeostasis ósea. Además, existen evidencias de que podrían ser efectivos en diversos contextos patológicos, como el

tratamiento del dolor o para mitigar las náuseas y los vómitos asociados con la quimioterapia contra el cáncer (Pertwee & Ross, 2002; T.W. et al., 2001).

Una de las aplicaciones terapéuticas más interesantes en la investigación de los cannabinoides son sus posibles propiedades antitumorales (Bifulco & Di Marzo, 2002). En este sentido, el efecto de los cannabinoides en el tratamiento de gliomas ha sido el más estudiado (Galve-Roperh et al., 2000; Massi et al., 2004; Sánchez et al., 1998, 2001). En estos tumores, el tratamiento con cannabinoides induce la apoptosis de células de glioma por acumulación de ceramidas y activación de una vía relacionada con el estrés del RE. La proteína p8 juega también un papel clave en este efecto, controlando la expresión de ATF-4, CHOP y TRB3. Esta cascada de eventos conllevaría la activación de la vía apoptótica intrínseca en la mitocondria (Velasco et al., 2007).

Estudios más recientes han demostrado que el cannabinoide WIN-55 induce apoptosis en gliomas promoviendo la activación de la caspasa-3 y la liberación del citocromo C. Además, se produciría un daño en el ADN mediado por ROS y una disfunción en la vía de señalización VEGF-AKT/FAK (K. Wang et al., 2021).

También se ha observado el efecto terapéutico de los cannabinoides en tumores de piel (Casanova, 2003), de páncreas (Carracedo, Gironella, et al., 2006), cáncer de mama (Caffarel et al., 2010), de próstata, de pulmón, linfoma y mieloma múltiple (M.V. Barbado et al., 2017) y se ha observado que el uso de THC en modelos murinos de EICH conduce a una recuperación temprana de la pérdida de peso corporal, reducción del tejido dañado en el hígado e intestino, así como aumento en la supervivencia. (Pandey et al., 2011)

Actualmente se están usando algunos compuestos cannabinoides en clínica:

- La nabilona, un análogo estructural del THC, fue aprobada recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para tratar las náuseas y los vómitos inducidos por la quimioterapia.
- El THC y su análogo sintético Dronabinol (Marinol®) se utilizan como estimuladores del apetito en pacientes con SIDA.
- Sativex, compuesto de THC y CBD, no está aprobado actualmente en los Estados Unidos, pero se encuentra en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer y para el tratamiento del dolor y la espasticidad

asociados con esclerosis múltiple. Sin embargo, Sativex está aprobado para su uso en Canadá y muchos países europeos.

- Además, hay al menos cinco fármacos adicionales a base de cannabis que han finalizado o están en fase de ensayos clínicos en varios países.(Malfitano et al., 2014).

2.4. Metabolismo en hemopatías malignas

2.4.1. Ceramidas y esfingolípidos

Los esfingolípidos son un tipo de lípidos bioactivos que se encuentran en las membranas celulares y desempeñan un papel fundamental en la transducción de señales para controlar funciones como el ciclo celular, senescencia, apoptosis, migración celular e inflamación.

La esfingosina (2-amino-4-octadeceno-1,3-diol o Sph) y dihidroesfingosina (2-amino-octadecano-1,3-diol o dhSph), también conocida como esfinganina, son los bloques de construcción básicos de todos los esfingolípidos en mamíferos. Además, existen diferentes variantes de ceramidas dependiendo de la longitud de su cadena de ácidos grasos y la isoforma enzimática que la sintetiza.

Por otro lado, algunas de las enzimas involucradas en la síntesis de ceramidas tienen actividad inversa y el metabolismo forma una "telaraña" donde diferentes rutas pueden converger y divergir en un mismo punto (Figura 6).(Espaillat et al., 2015)

Enzimas tales como la ceramidasa, esfingomielinasa, fosfatasa C1P, fosfatasa S1p, ceramida o esfingosina quinasas o SphK1 tendrían una expresión / actividad anormal en células leucémicas promoviendo así un desequilibrio entre lípidos anti y proapoptóticos. Dentro de las células, la esfingosina-1-fosfato (S1P), la ceramida-1-fosfato (C1P) o la glucosilceramida podrían tener un efecto antiapoptótico, promoviendo la inflamación, la supervivencia celular, la angiogénesis e invasión celular; mientras que la ceramida y la esfingosina tienen el efecto opuesto, modulando la apoptosis, detención del ciclo celular y senescencia (Figura 7). (Hernández-Corbacho et al., 2017).

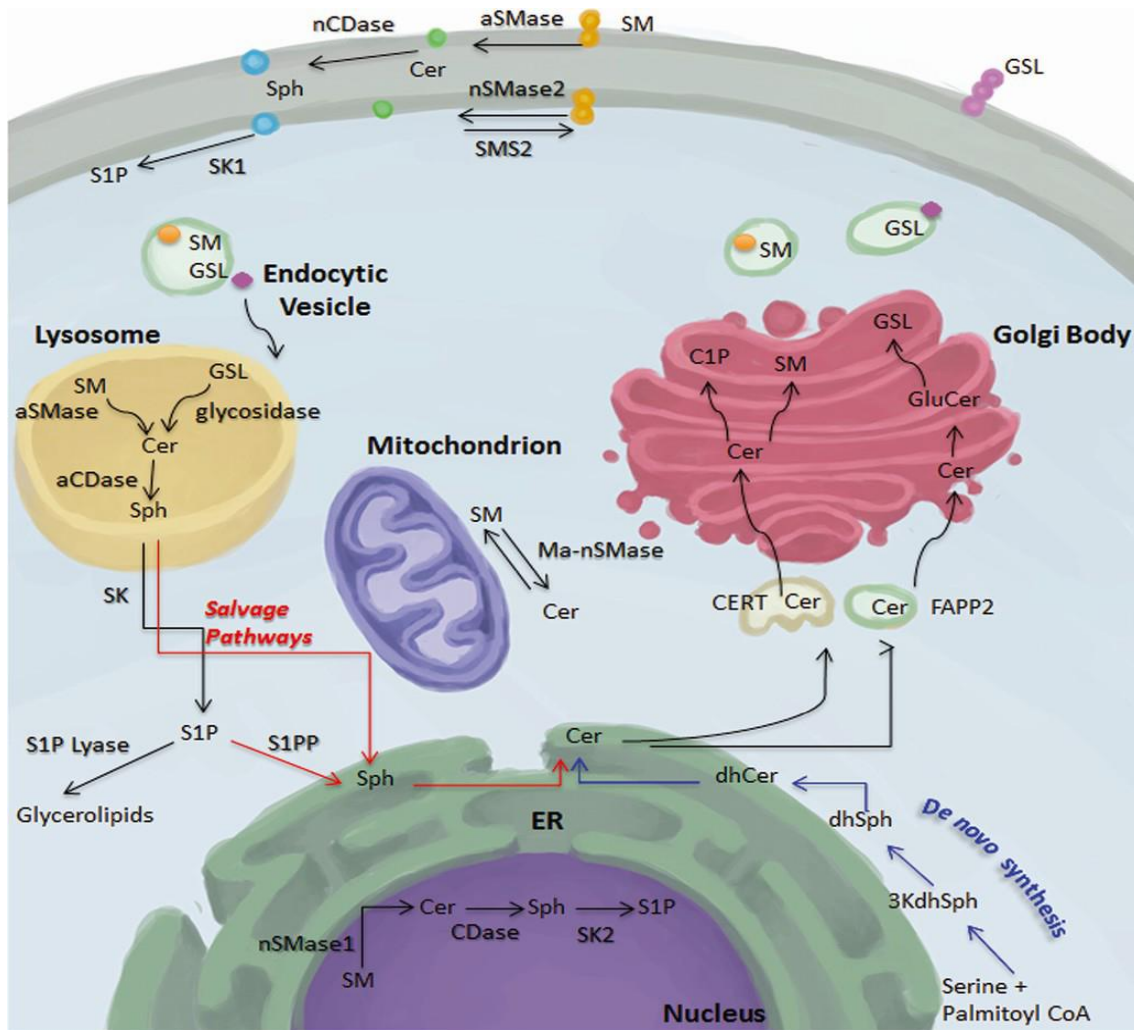


Figura 6. Esquema de las vías metabólicas de los esfingolípidos y su compartimentación subcelular. La síntesis de novo de esfingolípidos se origina en el retículo endoplásmico (RE), donde a través de una serie de reacciones de condensación y reducción se produce ceramida (Cer). La Cer también puede formarse en las membranas asociadas a las mitocondrias. La Cer generada de novo no se transporta por vesículas, sino por la proteína de transferencia de ceramida (CERT) y luego a través del transporte vesicular por la proteína adaptadora de cuatro fosfatos 2 (FAPP2) al Golgi. En el Golgi, Cer se modifica para formar esfingomielina (SM), ceramida-1-fosfato (C1P) y glucosilceramida (GluCer), esta última actúa como precursora de glucoesfingolípidos complejos (GSL). Después de la síntesis en el aparato de Golgi, la SM y el complejo GSL se envían a la membrana plasmática por transporte vesicular. Hay varias enzimas metabólicas de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática para regular los niveles de SM, Cer, esfingosina (Sph) y esfingosina-1-fosfato (S1P). La S1P es producida por las isoenzimas 1 y 2 de la esfingosina quinasa (SK) y puede transportarse a través de la bicapa para señalizar a través del receptor S1P (no mostrado). Durante la endocitosis, los esfingolípidos de membrana se internalizan y transportan al lisosoma a través de vesículas endocíticas, donde la hidrólisis es catalizada por la esfingomielinasa ácida (aSMase), ceramidasa ácida (aCDase) y glicosidasa. La Sph puede ser fosforilada por SK para formar S1P y seguir el eje metabólico de la producción de

glicerolípidos regulada por la liasa S1P. Alternativamente, S1P puede pasar por la vía de rescate para la generación de Cer. Espaillat et al., 2015

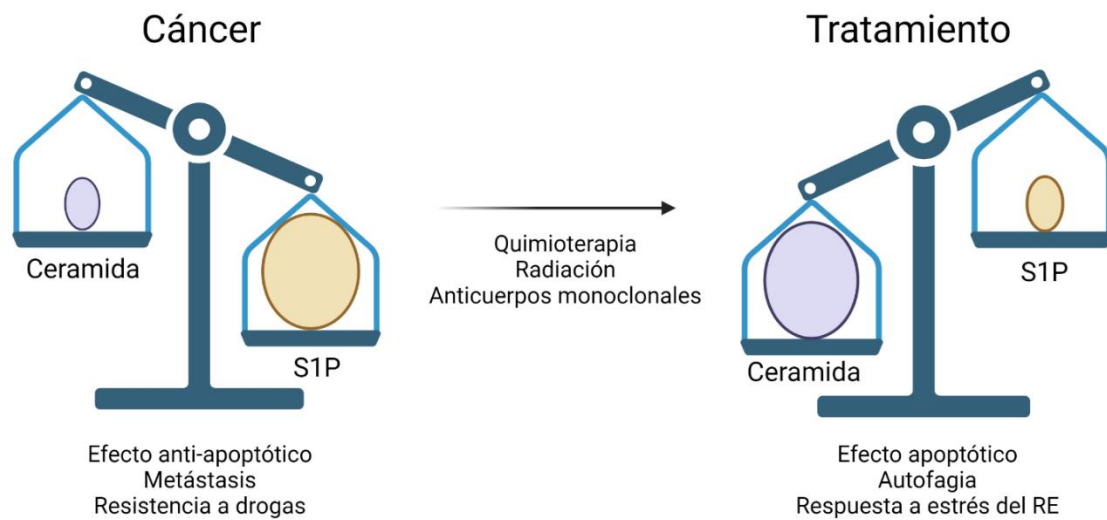


Figura 7. Equilibrio entre ceramida-S1P en cáncer y terapia.

Existe un equilibrio o reóstato entre la ceramida y la señalización de S1P en el cáncer. Un cambio hacia la acumulación de ceramidas conduce a efectos proapoptóticos, autofágicos, respuesta al estrés del RE y la no supervivencia, mientras que un cambio dinámico hacia la acumulación de S1P conduce a la supervivencia, tiene un efecto anti-apoptótico, metastásico y produce resistencia a los medicamentos (Adaptado de Selvam SP y Ogretmen B, 2013).

La composición de esfingolípidos es variable a lo largo de la diferenciación hematopoyética en humanos, y variaciones en la homeostasis de esfingolípidos sirven para regular el destino de las HSC. La delta 4-desaturasa, esfingolípidos 1 (DEGS1), por ejemplo, es una enzima esfingolípida necesaria para la función hematopoyética de las células madres y actúa activando la autofagia y la respuesta de proteína malplegadas (UPR, del inglés *Unfolded Protein Response*). (Xie et al., 2019)

En cuanto al papel de los esfingolípidos en neoplasias hematológicas, se ha descrito que la S1P puede actuar activando el factor de transcripción NF- κ B en la línea celular de LMA U937 (Shatrov et al, 1997) (Wallington-Beddoe et al., 2013), y se ha demostrado que los factores que promueven la proliferación en neoplasias hematológicas activan además a la esfingosina quinasa 1 (SPHK1), la cual se encuentra afectada en células de mieloma múltiple (Li et al, 2007a).

Estos datos sugieren que tanto la S1P como la SPHK1 pueden ser dianas intracelulares interesantes para el desarrollo de medicamentos contra la leucemia (Vorbach et al.,

2020). Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión del receptor de la esfingosina-1-fosfato tipo 3 (S1P3) en células madre hematopoyéticas es suficiente para inducir leucemia mieloide trasplantable. Por el contrario, la sobreexpresión de S1P3 en las poblaciones más maduras no provocaron una transformación maligna. (Vorbach et al., 2020).

2.4.1.1. Síntesis de ceramidas

La producción de esfingolípidos bioactivos está regulada en una red interconectada de reacciones en las que la producción de ceramidas se considera el eje central. Como podemos observar en la figura 8, la síntesis *de novo* de esfingolípidos bioactivos comienza con la condensación de serina y palmitoil CoA catalizada por la serina palmitoil transferasa (SPT) en la membrana del RE. Este paso inicial genera 3-cetoesfinganina, que se reduce posteriormente a dihidroesfingosina. A continuación, la dihidroceramida sintasa (DH-CerS) genera dihidroceramida mediante la adición de un grupo acil CoA. Posteriormente, la dihidroceramida desaturasa (DES) produce ceramida a través de una reacción de desaturación.

La ceramida se puede convertir en: esfingomielina, mediante la esfingomielina sintasa (SMS); glucosilceramida por la glucosilceramida sintasa (GCS) (y glucoesfingolípidos complejos) y fosforilada por la ceramida quinasa (CK) para formar ceramida-1-fosfato.

La ceramida también se puede generar de forma recíproca mediante las actividades enzimáticas de la esfingomielinasa (SMasa), la glucosilceramidasa (GCasa) y la ceramida-1-fosfato fosfatasa (C1PP). Además, la ceramida puede desacetilarse mediante ceramidasa (CDasa) para formar esfingosina, la cual puede ser fosforilada por la esfingosina quinasa (SK) para formar esfingosina-1-fosfato (S1P) o acetilada por la ceramida sintasa (CerS) en la ruta de rescate para regenerar ceramida. Finalmente, la S1P se puede desfosforilar por la S1P-fosfatasa (S1PP) para generar esfingosina, o ser degradada de forma irreversible por la S1P liasa (SPL), generando glicerolípidos a través de la producción de etanolamina fosfato y hexadecenal (Espaillat et al., 2015).

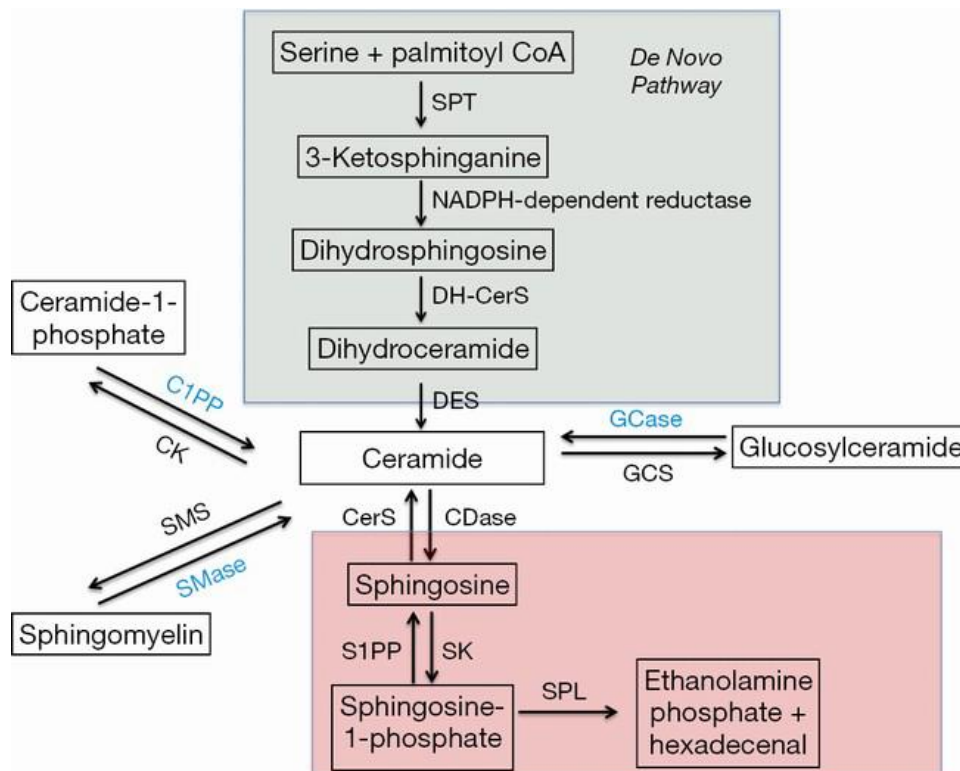


Figura 8. Representación esquemática de la vía metabólica de los esfingolípidos. (Espaillat et al., 2015)

2.4.1.2. Efecto de los cannabinoides en el metabolismo de las ceramidas

Estudios previos han sugerido que los cannabinoides pueden desempeñar su función a través de las ceramidas, promoviendo la síntesis *de novo* de las mismas y aumentando los niveles intracelulares de éstas. (Herrera et al., 2005; Sánchez et al., 2001)(Galve-Roperh et al., 2000; Gómez del Pulgar et al., 2002; M. Guzmán et al., 2001). La acumulación de ceramidas inducida por cannabinoides ha sido descrita en tumores del sistema nervioso central, específicamente en gliomas(Galve-Roperh et al., 2000; Velasco et al., 2012), así como en otros tumores sólidos tras el tratamiento con diferentes agentes quimioterápicos, como etopósido, estaurosporina, daunorrubicina o dexametasona(Grulich et al., 2000; Siskind, 2005). Sin embargo, aunque los mecanismos implicados en estos procesos aun se desconocen, se ha descrito que los esfingolípidos juegan un papel clave en la funcionalidad celular actuando como moléculas bioactivas que regulan la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular.

Debido a que la ceramida es el bloque fundamental para la síntesis de los esfingolípidos, ha sido definida como la "coordinadora" de las respuestas, ejerciendo

como "directora" de orquesta en los procesos apoptóticos (Morad & Cabot, 2013). De hecho, la alteración del metabolismo de los esfingolípidos es un elemento clave en el desarrollo del cáncer, por lo que actualmente se considera un "sello de identidad" de las células tumorales, que logran evadir los mecanismos apoptóticos evitando la acumulación de ceramidas. (Zhou & Blom, 2015).

A pesar de la evidencia que apunta a la ceramida como coordinadora de la respuesta apoptótica a los cannabinoides (y otros agentes quimioterapéuticos), actualmente se desconocen los mecanismos que median la acumulación de ceramidas y los procesos que controlan la regulación del perfil y patrón de esfingolípidos. Esto se debe principalmente a que el estudio de los lípidos, conocido como lipidómica, se encuentra en sus etapas iniciales, a diferencia de otras disciplinas "ómicas", como la genómica y la proteómica. Lamentablemente, la naturaleza química de los lípidos ha sido un obstáculo inherente al estudio y caracterización funcional de los lípidos, que ha quedado relegada a un segundo plano en el campo de la oncología (Schmelzer et al., 2007). De hecho, el desarrollo de la lipidómica está ligado al desarrollo tecnológico, que solo en los últimos años ha permitido destacar la importancia de los lípidos en la biología de la célula. A la dificultad y poca accesibilidad para el estudio de los lípidos, se suma la alta complejidad del metabolismo de los esfingolípidos (Yusuf A. Hannun & Obeid, 2011).

2.4.2. Metabolismo en LMA

Las HSC normales, las LSC y los blastos de LMA tienen perfiles metabólicos distintos y únicos. En comparación con la baja demanda de energía de las HSC normales, los blastos leucémicos requieren una mayor producción de adenosín trifosfato (ATP) para promover su mayor división celular y son más dependientes de vías metabólicas como la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato (PPP) necesarias para producir los componentes básicos de las macromoléculas. Por el contrario, las LSC dependen más del metabolismo mitocondrial para mantener su viabilidad y autorrenovación (Mesbahi et al., 2022).

Las vías metabólicas reprogramadas en LMA incluyen la glucólisis, la fosforilación oxidativa (OXPHOS), la síntesis de aminoácidos y la síntesis de lípidos (Figura 9).

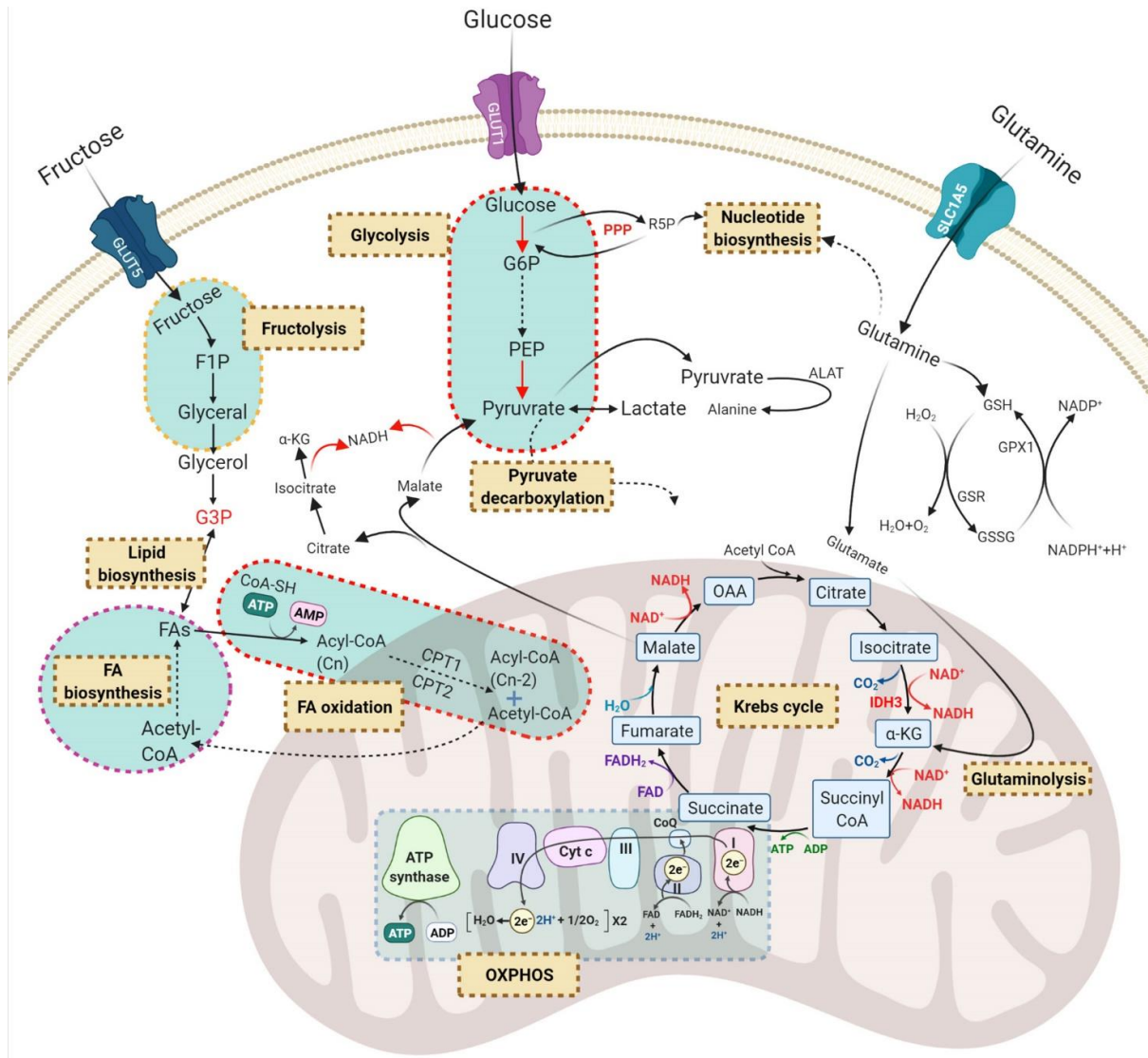


Figura 9. Esquema simplificado de las vías del metabolismo celular importantes para la fisiopatología de la LMA. Los nombres en los recuadros marrones indican las principales vías metabólicas.

GLUT, transportador de glucosa; G6P, glucosa-6-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; F1P, fructosa-1-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; G3P, glicerol-3-fosfato; OAA, oxalacetato; α-KG, α-cetoglutarato; PPP, ruta de las pentosas fosfato; ALAT, alanina transferasa; GSH, glutatión; GSR, glutatión-disulfuro reductasa; GPX1, glutatión peroxidasa 1; FA, ácido graso; GLS, glutaminólisis; OXPHOS, fosforilación oxidativa. (Mesbahi et al., 2022)

2.4.2.1. Glucólisis

La glucólisis es una vía de 10 pasos que convierte una molécula de glucosa en 2 de piruvato, con una producción neta de 2 moléculas de ATP, y en paralelo proporciona intermediarios para vías anabólicas. Cada paso de la reacción glucolítica es catalizado por una enzima o complejo enzimático específico. Algunas de estas enzimas

comprenden diferentes isoformas, que se expresan de una manera diferente dependiendo del contexto y del tejido, estando desreguladas en las células cancerígenas para contribuir a la glucólisis aeróbica. De estas enzimas, hay tres enzimas limitantes de la velocidad que se sabe que controlan el flujo glucolítico según las condiciones: hexoquinasa (HK), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PK)(Kreitz et al., 2019).

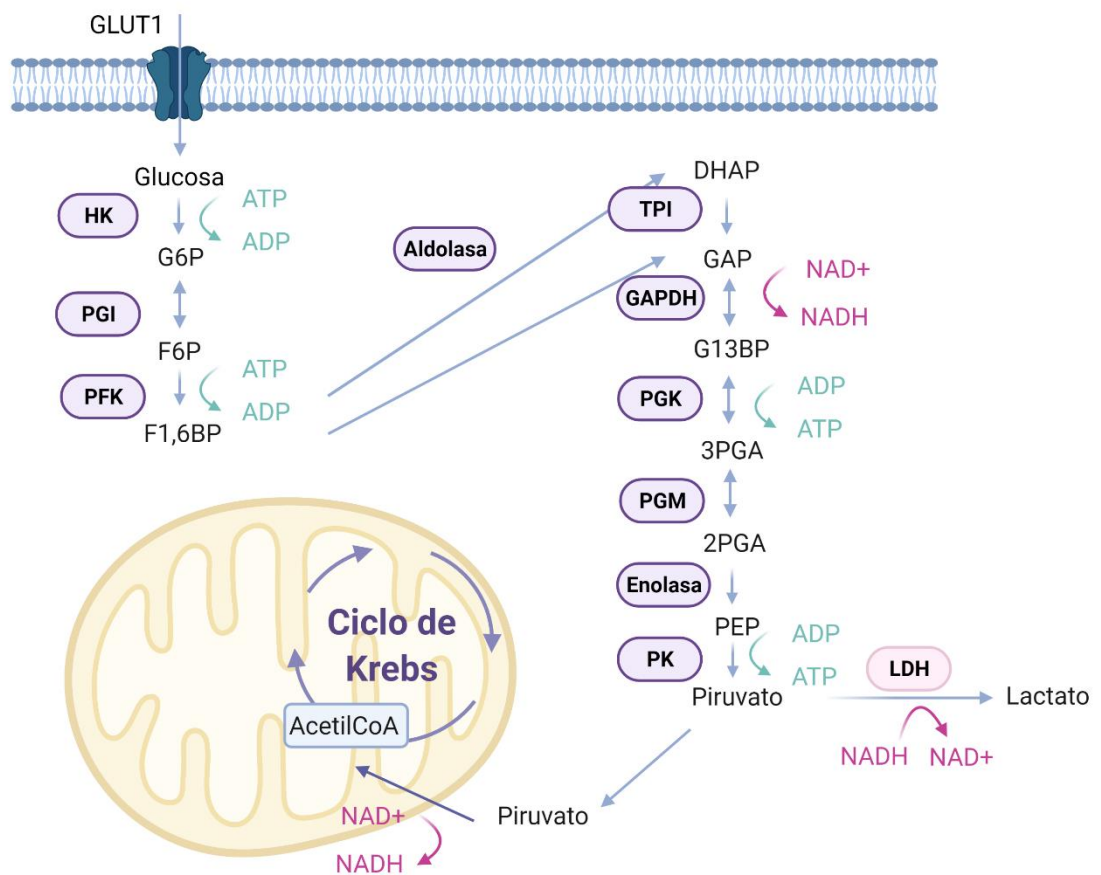


Figura 10. Esquema de la glucólisis

GLUT1, transportador de glucosa tipo 1; HK, hexoquinasa; G6P, glucosa-6-fosfato; PGI, glucosa 6-fosfato isomerasa; F6P, fructosa-6-fosfato; PFK, fosfofructoquinasa; F1,6BP, fructosa-1,6-bifosfato; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; TPI, triosafosfato isomerasa; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; GAPDH, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa; G13BP, 1,3-bisfosfoglicerato; PGK, fosfoglicerato quinasa; 3PGA, 3-fosfoglicerato; PGM, fosfoglicerato mutasa; 2PGA, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PK,piruvato quinasa; LDH, lactato deshidrogenasa.

La entrada de glucosa en las células se lleva a cabo mediante difusión facilitada a través de la familia de los transportadores de glucosa (GLUT). Una vez en la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima hexokinasa (HK) con el consumo de una molécula de ATP. La siguiente enzima glucolítica de la vía es la glucosa 6-fosfato isomerasa (PGI), que cataliza la reacción reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (F6P), la cuál es convertida hasta fructosa-1,6-bifosfato (F1,6BP) por la fosfofructoquinasa (PFK). El fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) y el 3-fosfato de gliceraldehído (GAP) se crean a partir de la F1,6BP mediante la aldolasa. El DHAP se convertirá en GAP por la triosafosfato isomerasa (TPI), donde ahora las dos moléculas de GAP continuarán por el mismo camino. El gliceraldehído-3-fosfato se oxidará en una reacción exergónica a 1,3-bisfosfoglicerato (G13BP), reduciendo una molécula de NAD^+ a NADH y H^+ . El G13BP se convertirá luego en 3-fosfoglicerato (3PGA) con la ayuda de la fosfoglicerato quinasa (PGK), junto con la producción de la primera molécula de ATP a partir de la glucólisis. Posteriormente el 3PGA se convertirá, con la ayuda de la fosfoglicerato mutasa (PGM), en 2-fosfoglicerato (2PGA). Con la liberación de una molécula de H_2O , la enolasa producirá fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de 2-PGA. Debido al estado inestable de la PEP, la piruvato quinasa (PK) facilitará la pérdida de un grupo fosfato para crear el segundo ATP en la glucólisis. Por lo tanto, PEP luego se convertirá en piruvato (Figura 10)(Lenzen, 2014).

2.4.2.1.1. Glucólisis en LMA

Se ha descrito que la glucólisis aumenta en las células leucémicas. Curiosamente, las células que inician la leucemia dependen de un alto flujo glucolítico mediado por la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), y la delección de AMPK inhibe la proliferación de las células leucémicas al comprometer el flujo de glucosa a través de una menor expresión de GLUT1 y al aumentar el estrés oxidativo y el daño del ADN.

El alto flujo de glucólisis también se correlaciona con un nivel disminuido de autofagia y la resistencia a fármacos, por lo que las terapias dirigidas frente a la glucólisis pueden ser, por tanto, una estrategia viable para el tratamiento de la LMA.

También hay que destacar la capacidad de las células de LMA para adaptar su metabolismo al microambiente que se genera en la MO, y es que, debido a su alto índice de consumo de glucosa, las células aumentan la expresión del transportador GLUT5 para contrarrestar su déficit en el medio, lo que les permite utilizar fructosa como sustrato alternativo para la glucólisis. Además, se ha descrito que un bloqueo de la absorción de fructosa reduce la leucemogénesis y potencia la citotoxicidad de la citarabina.

Finalmente, las células leucémicas también controlan su mayor necesidad de glucosa independientemente de los mecanismos intrínsecos. La inducción de un "estado diabético" en el huésped, a través de la regulación de diferentes mecanismos que conllevan la supresión de la secreción de insulina, permite una mayor disponibilidad de glucosa para impulsar su propio crecimiento.

Por tanto, la adicción de las células de LMA a la glucólisis, vía metabólica frecuentemente regulada al alza para acelerar su capacidad proliferativa, crea por tanto una vulnerabilidad metabólica que puede aprovecharse terapéuticamente. (Chapuis et al., 2019)

2.4.2.2. Vía de las pentosas fosfatos

La vía de las pentosas fosfato es una vía metabólica que genera NADPH y pentosa. Los genes implicados en la PPP están también sobreexpresados en muchos tumores.

En LMA, Chen et al. han estudiado las posibles alteraciones genéticas de los genes implicados en esta vía y comprobaron que estaban regulados positivamente en el 61% de los pacientes con LMA, estando sobreexpresados genes como G6PD, PFKL, PFKP y PGLS en todos los casos (Y. Chen et al., 2016).

Por otro lado, la supervivencia de las células de LMA depende en gran medida de la glucólisis, que permite mantener un alto flujo de glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato, lo que convierte a la enzima que se encarga de este paso, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en una posible diana terapéutica. De hecho, se ha visto que la sobreexpresión de G6PDH se correlaciona con un pronóstico adverso en la LMA, y se ha observado una actividad antileucémica de 6-AN, un inhibidor de la G6PDH (Y. Chen et al., 2016).

2.4.2.3. Metabolismo mitocondrial en LMA

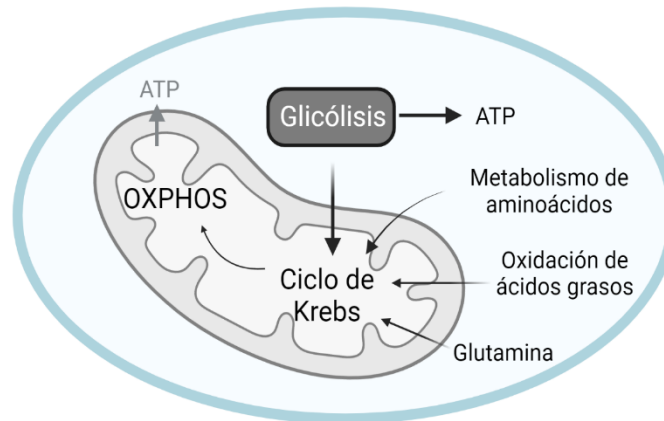
Las mitocondrias juegan un papel fundamental en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y los aminoácidos, los cuales son esenciales para la proliferación de las células tumorales (Carter et al., 2020). Las células tumorales muestran una variedad de cambios en su metabolismo, que les permiten satisfacer las altas demandas bioenergéticas y biosintéticas para una rápida división celular. La principal adaptación metabólica se conoce como glucólisis aeróbica o "efecto Warburg", que implica un cambio metabólico para aumentar la vía glucolítica como fuente principal de ATP, en lugar de fosforilación oxidativa (OXPHOS), independientemente de la presencia de oxígeno (Leni et al., 2013). Además, también se induce una regulación positiva del metabolismo de glutamina, de la oxidación de ácidos grasos y del metabolismo de aminoácidos.

En neoplasias hematológicas se ha descrito que la manipulación de la vía glucolítica a distintos niveles puede inhibir la proliferación de las células malignas mediante la restauración del metabolismo normal (Leni et al., 2013). También se ha descrito que las células de LMA y las células madres leucémicas tienen una masa mitocondrial más alta que las células hematopoyéticas homólogas o las células madre hematopoyéticas normales, respectivamente. A pesar de este aumento en la masa mitocondrial, no se ha detectado un aumento paralelo en la actividad de la cadena respiratoria, y las células de la LMA presentan una menor capacidad de reserva (capacidad respiratoria máxima cuando el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) está desacoplado). Esta aparente disfunción mitocondrial conduce a un mayor estrés oxidativo mitocondrial en las células de LMA y, en consecuencia, a un incremento en los niveles de ROS.

Las células de LMA también muestran una regulación positiva de las vías de biosíntesis de ADN mitocondrial (ADNmt) en comparación con las células hematopoyéticas normales y la inhibición de estas vías correlaciona con la inhibición de la función mitocondrial, y específicamente con la OXPHOS, ya que las 13 proteínas codificadas por el ADN mitocondrial forman parte de la maquinaria OXPHOS. Además, las células de LMA, incluidas las células madre leucémicas (LSC, del inglés *leukemic stem cell*), sobreexpresan la proteína antiapoptótica BCL-2, que puede funcionar indirectamente para regular la OXPHOS mitocondrial.

Estos estudios han demostrado la dependencia única de la función mitocondrial que tiene la LMA en comparación con las células hematopoyéticas normales (Figura 11)(Carter et al., 2020).

Metabolismo de las HSC



Metabolismo de las LSC

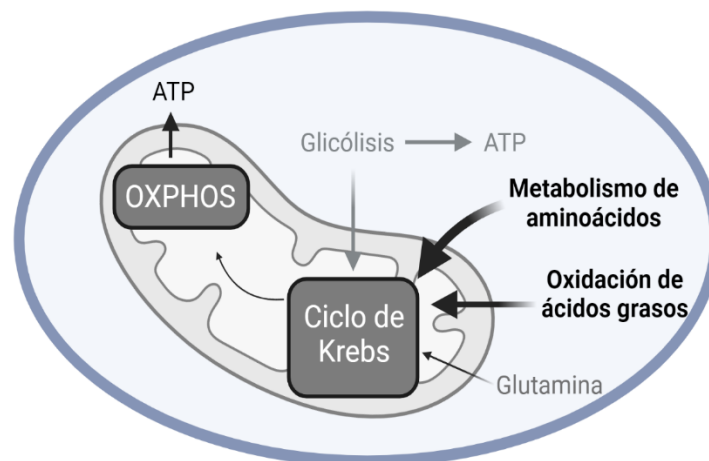


Figura 11. Metabolismo de las células madre hematopoyéticas y las células madre leucémicas. Las células madre hematopoyéticas (HSC) normales son dependientes de la glucólisis y en menor medida, de la vía OXPHOS para sustentar el metabolismo celular y la supervivencia. Las LSC dependen exclusivamente de OXPHOS para apoyar el metabolismo celular y la supervivencia y muestran deficiencia glucolítica. Las LSC se basan en el metabolismo de los aminoácidos sobre la oxidación de los ácidos grasos o la glutamina para alimentar el ciclo de Krebs en la mayoría de los casos. (Adaptado de Carter et al., 2020)

2.4.2.4. Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs, también conocido como ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo TCA), es una ruta central para la fosforilación oxidativa en las células y cumple con sus requisitos de equilibrio bioenergético, biosintético y redox. A pesar del dogma inicial de que las células cancerosas evitan el ciclo de Krebs y utilizan principalmente la glucólisis aeróbica, existen evidencias que demuestran que ciertas células cancerosas dependen en gran medida del ciclo de Krebs para la producción de energía y la síntesis de macromoléculas (Berg JM, 2002).

El ciclo de Krebs comienza con la entrada del producto final derivado del piruvato en la glucólisis, el acetil-CoA. A través de una serie de reacciones redox, la energía de enlaces químicos del acetil-CoA produce electrones de alta energía, que son transportados a la cadena de transporte de electrones por el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD).

La fosforilación oxidativa posterior da como resultado la producción de adenosina trifosfato (ATP) a partir de cada acetil-CoA. Debido al requerimiento de oxígeno para la regeneración del NAD^+ y el FAD, el ciclo de Krebs solo funciona en ambientes aeróbicos.

El ciclo de Krebs consta de un total de 8 reacciones químicas, tres de las cuales son irreversibles; i) la generación de citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA; ii) la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG); y iii) la formación de succinil-CoA a partir de α -KG (Berg JM, 2002; Akram, 2014).

Las reacciones bioquímicas en el ciclo de Krebs se regulan mediante la disponibilidad de sustrato, la inhibición por producto, la disponibilidad de nutrientes y la regulación alostérica de algunas enzimas, que permite que la célula controle la producción de energía en función de su estado energético (relación NADH/NAD^+ o disponibilidad de ATP) (Berg JM, 2002). Los metabolitos intermediarios del ciclo pueden derivarse de fuentes externas, como la producción de acetil-CoA a partir de la β -oxidación de ácidos grasos, o la producción de α -KG a partir del catabolismo de proteínas, en particular la glutaminólisis (Houten y Wanders, 2010; Akram, 2014). Es importante destacar que la desregulación de genes implicados en el ciclo de Krebs, o la acumulación aberrante de intermediarios pueden tener consecuencias relevantes en cáncer. (N. M. Anderson et al., 2018)

2.5. Papel de PARP1 y del proceso de poli ADP-ribosilación en la biología celular

2.5.1. Funciones de PARP1

Las polimerasas de poli (ADP-ribosa), también conocidas como PARP, son una familia de enzimas nucleares dependientes de ADN que catalizan la transferencia de residuos de ADP-ribosa a una gran variedad de proteínas diana usando el nucleótido de nicotinamida NAD⁺ celular. Aunque han sido consideradas como elementos de la maquinaria de reparación del ADN residentes en el núcleo, estudios recientes han revelado un importante papel fisiológico de las PARPs en numerosas regiones extranucleares (Cseh et al., 2017).

2.5.1.1. Reparación del daño en el ADN

El mantenimiento de la integridad del genoma depende principalmente de una red de diferentes mecanismos de reparación, colectivamente denominado respuesta al daño del ADN (DDR). Décadas de investigación han revelado que PARP es uno de los pilares de la DDR. (Wei & Yu, 2016).

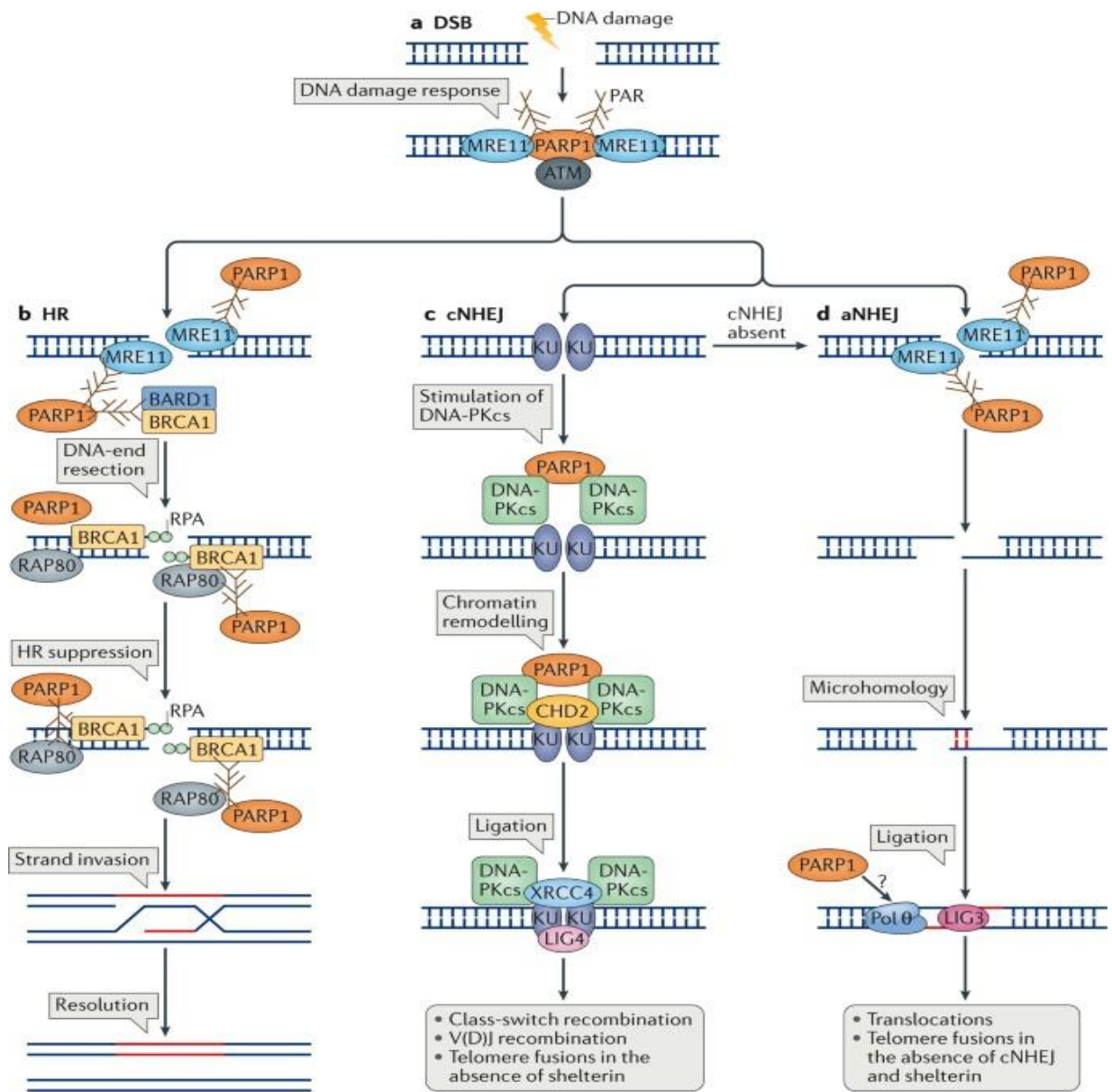
En LMA, los genes que codifican los factores de transcripción mieloide, los receptores de señalización que regulan la proliferación celular y los modificadores epigenéticos pueden afectarse por mutaciones adquiridas somáticamente o por translocaciones cromosómicas. Estas mutaciones pueden modificar la organización de la cromatina en regiones donde se encuentren genes que regulan la proliferación de las HSC, la diferenciación y la reparación del ADN, contribuyendo al desarrollo y progresión de la enfermedad. (Pennisi et al., 2018)

La secuenciación de las uniones de translocación en las leucemias agudas ha revelado que las translocaciones probablemente están mediadas por una vía de reparación de corte de doble cadena del ADN, denominada unión de extremos no homólogos (NHEJ). Hay 2 tipos principales de NHEJ: (1) la vía clásica iniciada por el complejo KU (KU70/KU80) y (2) la vía alternativa iniciada por la poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1). Estudios recientes sugieren que los componentes de reparación de la NHEJ clásicos reprimen las translocaciones, mientras que los componentes de la vía de NHEJ alternativos son necesarios para las translocaciones (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017) (Figura 12).

El paso limitante de NHEJ alternativo es el desplazamiento del complejo KU por la PARP1. Estudios de inhibición de PARP1 mediante el uso de inhibidores o de represión de la expresión de la proteína PARP1 han demostrado que la pérdida e función de PARP1 disminuía drásticamente las translocaciones cromosómicas (Wray J et al.), lo que implica que PARP1 es esencial para este proceso y plantea la posibilidad de que las translocaciones oncogénicas que ocurren tras tratamiento con dosis altas de quimioterapia o radiación se puedan prevenir mediante la inhibición de PARP1.(Wray et al., 2013)

PARP1, junto con γ H2AX, BRCA1 y BRCA2 son indicadores moleculares convencionales del daño del ADN en las células y, a menudo, se sobreexpresan en cánceres.(Park et al., 2015). Se ha observado que los pacientes con alta expresión de PARP1 tienen niveles más altos de células blásticas en la médula ósea y mayores recuentos leucocitarios en sangre periférica, y se asoció con una mayor frecuencia de la mutación FLT3-ITD. Además, la supervivencia general y la supervivencia libre de eventos de los pacientes con alta expresión de PARP1 fueron significativamente más cortas que las del grupo con baja expresión. (Li et al., 2018).

Mientras que el papel de PARP1 en la maquinaria de reparación de ADN está bien establecido, solo el 60% de los complejos de PARP1 son detectados en roturas de ADN, lo que sugiere la existencia de funciones de PARP1 independientes de la reparación(Cseh et al., 2017).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 12. Funciones de PARP1 en la detección y reparación de roturas de doble cadena del ADN (DSB). (A) Se requiere PARP1 para la detección de DSB y para la respuesta inicial al daño del ADN a través de su interacción con la proteína reparadora de doble hebra MRE11 y la proteína de control de ciclo celular ATM. (B) PARP1 juega un papel en la resección del extremo del ADN durante el proceso de recombinación homóloga (HR) a través del reclutamiento de MRE11 a los DSB, que es seguido por la unión de la hebra sencilla por la proteína de replicación RPA. (C) PARP1 también participa en la reparación de DSB estimulando la unión de extremos no homólogos clásico. (D) PARP1 tiene un papel en el NHEJ alternativo, que está activo en ausencia del clásico. El NHEJ alternativo requiere el procesamiento de los extremos de ADN por MRE11, que es reclutado por PARP1 (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017).

2.5.1.2. Regulador mitocondrial

La hiperactivación exacerbada de PARP1 se caracteriza por un consumo excesivo de NAD⁺ nuclear acompañado de su agotamiento a nivel citosólico. Esta depleción de NAD⁺ compromete las funciones de las vías metabólicas dependientes de NAD⁺, como la glucólisis y el ciclo de Krebs (TCA), pudiendo culminar en un mal funcionamiento de la cadena respiratoria de electrones y la consecuente acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 13). También se ha documentado que la permeabilidad mitocondrial inducida por ROS puede conducir a una pérdida de NAD⁺ intra-mitocondrial. Por tanto, la hiperactivación de PARP1 podría iniciar eventos que no solo agravan el daño de las mitocondrias, sino que también contribuyen a la generación de roturas adicionales de ADN monocatenario mediadas por ROS.

Estos hallazgos inspiraron la idea de que los inhibidores de PARP podrían ejercer un efecto citoprotector limitando el agotamiento de NAD⁺ celular inducido por PARP1 y, en consecuencia, preservando la bioenergética mitocondrial.

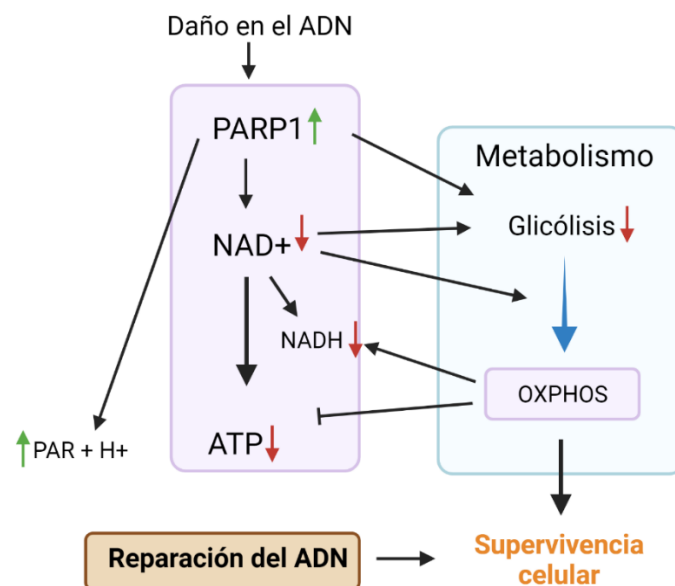


Figura 13. Efecto de la activación de PARP1 en la supervivencia celular. La actividad de PARP1 dependiente del daño en el ADN provoca la PARilación de proteínas dianas y la disminución de NAD⁺ y ATP. La PARilación en los sitios de daño del ADN promueve el reclutamiento de modificadores de cromatina y facilita la reparación del ADN.

Mientras que la PARilación también suprime la glucólisis a través de la inhibición de HK, el consumo de NAD⁺ debido a la PARilación también inhibe la glucólisis. Como resultado, el

consumo de NAD⁺ por PARP1 desencadena un cambio general de dependencia metabólica a OXPHOS, lo que contribuye a la disminución de NADH. En respuesta al daño al ADN y a la activación de PARP1, la vía OXPHOS se convierte en fundamental para la reposición de ATP. (Adaptado de Murata et al, 2019).

Otros estudios han planteado la posibilidad de que el efecto protector de la inhibición de PARP1 están mediados por la vía AKT/PKB. Aunque la relación entre el metabolismo y la vía AKT / PKB se ha conocido durante décadas, la implicación de esta vía en la mitocondria se describió por primera vez en 2003. (Cseh et al., 2017)

2.5.1.3. Actividad enzimática de PARP1

La poli(ADP-ribosil)ación (ó PARilación) es una modificación postraduccional de proteínas mediante la adición de cadenas lineales o ramificadas de unidades del monómero ADP-ribosa. Usando NAD⁺ como donador de ADP-ribosa, las proteínas PARPs transfieren estos residuos a las cadenas laterales de los residuos de arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, lisina, serina y tirosina de las proteínas diana (Gibson & Kraus, 2012). La enzima central para la producción de polímeros de poli (ADP-ribosa) (PAR) en células y la principal diana de la poli (ADP-ribosil)ación durante el daño del ADN es PARP1. (Alemasova & Lavrik, 2019)

Se ha visto que la síntesis de PAR mediada por PARP1, pero no el agotamiento directo de NAD⁺, bloquea la glucólisis y conduce a la pérdida de ATP. Estos hallazgos apoyan un modelo en el que la hiperactivación de PARP1 conduce a la inhibición y deslocalización de la hexoquinasa-1, causando una reducción de la glucólisis y el agotamiento del ATP celular. (Fouquerel, Goellner, Yu, Gagné, Moura, et al., 2014).

2.5.1.4 Parthanatos: Muerte mediada por AIF

La muerte celular mediada por PARP se denomina parthanatos, en referencia al polímero de poli (ADP-ribosa) (PAR), que es el producto de la activación de PARP1 y "*thanatos*", que es la personificación griega de la muerte y la mortalidad. (Harrasz, et al., 2008).

Parthanatos es un proceso que depende de la actividad de PARP y no requiere la mediación de las caspasas para su ejecución, pero es claramente dependiente de la translocación nuclear del factor inductor de apoptosis asociado a mitocondrias (AIF).

AIF es una flavoproteína NADH oxidasa normalmente anclada a la membrana mitocondrial interna, contribuyendo al mantenimiento del complejo I.

La sobreactivación de PARP provoca la poli (ADP-ribosa)ribosilación excesiva y conlleva la translocación nuclear de la proteína AIF mitocondrial, que causa una fragmentación del ADN a gran escala (50 kb) y la condensación de la cromatina, y conduce a la muerte celular (Fatokun et al., 2014) (Heeres & Hergenrother, 2007) (Figura 14).

El polímero PAR generado tras la sobreactivación de PARP1 está considerado como la molécula clave en la cascada de señalización de parthanatos (Andrabi et al., 2006).

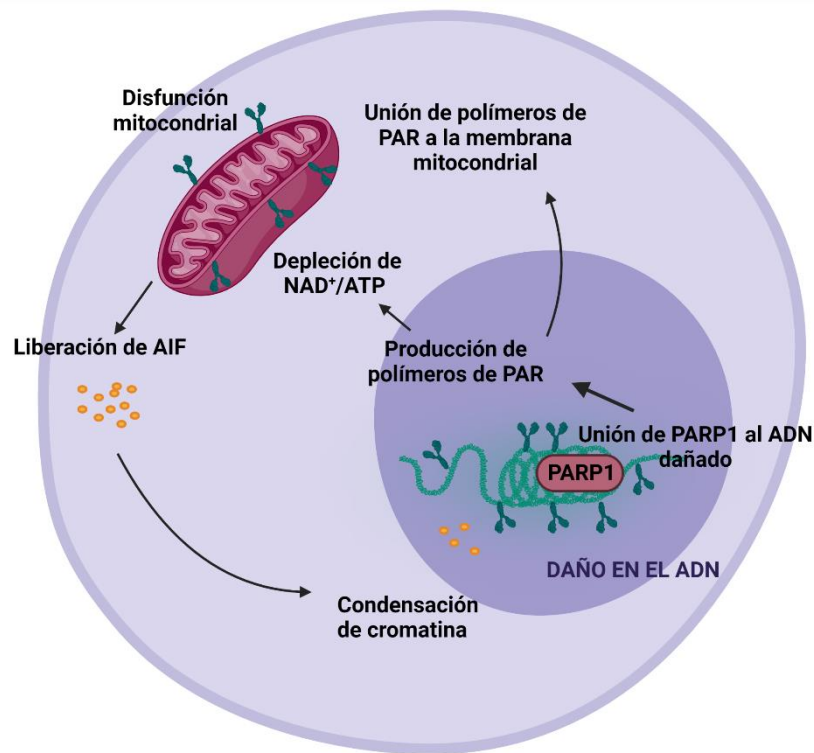


Figura 14. Esquema de los efectos producidos tras la muerte celular dependiente de la sobreactivación de PARP1 o parthanatos.

2.5.2. Inhibidores de PARP: Olaparib

En base a su papel central en la maquinaria de reparación nuclear, PARP1 se considera una diana potencial para el tratamiento del cáncer, cuyas células presentan una maquinaria de reparación de corte de doble cadena defectuosa. De acuerdo con

este concepto, cánceres BRCA1/2 negativos son adictos a la función de PARP, cuya inhibición actuaría como un "segundo golpe" en el mal funcionamiento de la maquinaria de reparación celular, que daría lugar a inestabilidad cromosómica exacerbada que provocaría la detención del ciclo celular y la apoptosis. Esto llevó al desarrollo terapéutico de inhibidores de PARP y su aplicación para potenciar los agentes alquilantes antineoplásicos (Cseh et al., 2017).

Olaparib (AZD-2281, Ku-0059436) es un inhibidor de PARP actualmente en investigación en pacientes con tumores sólidos. Está diseñado para actuar como un inhibidor competitivo de NAD^+ en el sitio catalítico de PARP1 y PARP2, ambos miembros de la familia de enzimas PARP, que son fundamentales para la reparación de roturas de cadena sencilla del ADN (SSB) mediadas a través de la vía de reparación por escisión de bases (BER). La inhibición de la vía BER por Olaparib conduce a la acumulación de SSB no reparados, que tras la replicación del ADN conduce a la formación de roturas de doble hebra (DSB) deletéreas, en ausencia de un mecanismo de recombinación homóloga (HR) funcional.

En células con una vía de HR funcional, estos DSB se pueden reparar de forma eficaz. Sin embargo, en tumores con deficiencias de reparación de HR, Olaparib causa letalidad sintética a través de la combinación de dos eventos moleculares que de otra manera no son letales cuando se producen de forma aislada.

Olaparib ya está aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario recidivante con mutación en BRCA, y se ha demostrado que proporciona beneficios clínicamente significativos entre estos pacientes. Olaparib también ha mostrado una actividad prometedora en pacientes con cáncer de mama o de próstata metastásico con mutaciones en BRCA en la línea germinal. Además de su uso como agente único, Olaparib también puede actuar como quimio y/o radiosensibilizador, debido a su capacidad para potenciar los efectos citotóxicos de estos agentes terapéuticos. Sin embargo, todavía no se ha demostrado un beneficio claro para el paciente con esta última aplicación. (Bochum et al., 2018).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. Hipótesis y Objetivos

4.1 Hipótesis

Algunos estudios sugieren que los cannabinoides ejercen un efecto proapoptótico en distintos tumores, como el glioma. Si los receptores CB2 se expresan principalmente en células hematopoyéticas, y de forma más elevada en células tumorales que en sanas, el uso de derivados cannabinoides podría ser un tratamiento dirigido en hemopatías malignas.

4.2 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es evaluar la utilidad potencial de los cannabinoides en el tratamiento de las hemopatías malignas, específicamente el mieloma múltiple (MM) y la leucemia mieloblástica aguda (LMA).

Como objetivos secundarios:

a) Evaluaremos el mecanismo de acción, y el perfil de toxicidad del derivado cannabinoide WIN-55 212,2. También se evaluará la expresión de receptores cannabinoides en las distintas estirpes celulares y se comprobará si esta expresión está relacionada con los efectos de los cannabinoides.

b) Se determinarán las vías de señalización celular implicadas en el efecto de los cannabinoides. Particularmente evaluaremos su efecto sobre el metabolismo celular.

c) Analizaremos el efecto de los cannabinoides sobre organelas específicas, concretamente mitocondria y retículo endoplásmico, evaluando el daño mitocondrial o estrés del retículo endoplasmático según proceda.

d) Por último, se evaluará el efecto de este fármaco en modelos murinos de mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda, así como el posible efecto sinérgico con otros fármacos ya usados actualmente en clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales

4.1. Material biológico

4.1.1. Líneas celulares tumorales

4.1.1.1. Líneas de MM

Para los estudios de MM se usaron seis líneas celulares humanas. Las líneas U266, RPMI 8226 (en adelante RPMI) y MM1.S (sensible a la dexametasona) se adquirieron en ATCC (Manassas, Virginia, USA) y las líneas U266-LR7 (resistente a melfalán), RPMI 8226-LR5 (resistente a melfalán) y MM1.R (resistente a dexametasona) fueron amablemente cedidas por el Dr. Enrique Ocio (Hospital Universitario de Salamanca, España). Estas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO® Invitrogen) suplementado con 10% (o 15% en el caso de la línea U266) de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO® Invitrogen) según lo recomendado por el proveedor.

4.1.1.2. Líneas de LMA

En el caso de la LMA, las líneas celulares humanas HL60, KG-1a y MV-4-11 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) se cultivaron en medio IMDM (GIBCO® Invitrogen) suplementado (100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 10% de FBS); y la línea celular U937 (DMSZ, Braunschweig, Alemania), que se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado.

Todas las células se cultivaron en atmósfera humidificada de CO₂ / aire (5% / 95%) y 37°C y fueron sometidas a pruebas periódicas de detección de micoplasma.

4.1.2. Muestras humanas sanas

Las leucoaféresis o los concentrados leucoplaquetarios o buffy coats de donantes usados para el aislamiento de linfocitos B (CD19⁺) y T (CD3⁺), o de células

madres hematopoyéticas (HSC o CD34⁺) respectivamente se obtuvieron del Centro Regional de Transfusiones y Hemodonación del Hospital Virgen del Rocío, previa firma del consentimiento informado.

4.1.3. Muestras humanas tumorales

Las células primarias humanas de pacientes con MM y LMA para los ensayos ex vivo se obtuvieron del Servicio de Hematología del Hospital Virgen del Rocío en el momento del diagnóstico, previa firma del consentimiento informado siguiendo la normativa del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de los Hospitales Virgen del Rocío y Macarena.

4.1.3.1. Muestras de pacientes con MM

Las células plasmáticas mielomatosas (CPM) se obtuvieron de médula ósea (MO) de pacientes con un grado de infiltración celular >30% (Tabla 2).

ID. PACIENTE	CITOGENÉTICA	RESPUESTA a 1ª línea de tratamiento
UPN-1	IgH translocado (14q32)	Refractariedad primaria
UPN-2	t (4;14)	Respuesta Parcial
UPN-3	Del(17p) p53	Refractariedad primaria
UPN-4	t (11;14)	N/E (Muerte al diagnóstico)
UPN-5	del(13q14), del (17p) p53, hipodiploidía	Respuesta parcial
UPN-6	amp(1q), trisomía 7	Enfermedad refractaria

Tabla 2. Características de los pacientes de MM usados en los estudios ex vivo. En ella se muestra las alteraciones citogenéticas al igual que la respuesta tras la 1ª línea de tratamiento con la quimioterapia convencional. (UPN= Unique patient number)

4.1.3.2. Muestras de pacientes con LMA

Los blastos se obtuvieron de médula ósea de pacientes con LMA en el momento del diagnóstico. En la tabla 3 se detallan las características de cada uno de los pacientes estudiados.

ID. PACIENTE	Cariotipo/Estudio Molecular	Genes mutados	% Infiltración en MO
UPN-1	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[18]/46,XY[2]	Sin mutaciones patogénicas encontradas	57,40
UPN-2	46,XX,del(7)(q22q32)[13]	GATA2, PTPN11	40,40
UPN-3	46,XY,t(2;8;21;8)(q31;q23;q22;q22)[20]	Sin datos registrados	52,20
UPN-4	PML/RARA-t(15;17)(q22;q21)	Sin mutaciones patogénicas encontradas	93,60
UPN-5	46, XY	NPM1, TET2, TP53	64,80
UPN-6	46,XY,inv(16)(p13q22)[12]	FLT3, KIT, KRAS	41,40
UPN-7	46,XX[20]	ASXL1, DNMT3A, KRAS, NPM1	71,00
UPN-8	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[9]/46,XY[1]	CEBPA, TET2	78,80
UPN-9	46,XX,ins(10;11)(q23;p12p12)[20]	Sin mutaciones patogénicas encontradas	89,90
UPN-10	46,XX[10]	DNMT3A, NPM1, PTPN11	33,90
UPN-11	46,XX[20]	NPM1, WT1, TET2	81,00
UPN-12	45,XY,del(5)(q15q33),dic(17;20)(p13;q13.2)[19]/46,XY[1]	Sin datos registrados	19,80
UPN-13	46,XX[15]	NPM1, GATA2, TET2	81,00
UPN-14	Sin datos registrados	RUNX1, IDH1, DNMT3A	88,00
UPN-15	46,XY,-7[10]	RUNX1, FLT3-TKD, NRAS, PTPN11	74,00
UPN-16	46,XX[3]	DNMT3, TET2	81,40
UPN-17	Sin datos registrados	Sin datos registrados	96,90
UPN-18	47,XY,+8[12]/48,XY,+6,+8[8]	Sin mutaciones patogénicas encontradas	95,20
UPN-19	Sin datos registrados	FLT3, NPM1, TET2, ETV6, CALR	96,10
UPN-20	46, XY	IDH1	66,90
UPN-21	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]	Sin datos registrados	90,00
UPN-22	Sin datos registrados	IDH2, RUNX1	64,30
UPN-23	46, XX	NPM1, IDH1	58,20
UPN-24	46, XY	SRSF2, IDH2	95,00
UPN-25	Sin datos registrados	SRSF2, IDH2, CEBPA, STAG2	83,1
UPN-26	Sin datos registrados	NPM1, FLT3-ITD, TET2	94,30
UPN-27	t(8,21) AML1-ETO (3140000)	KIT, NF1	23,30

	copies/ABL:1360000)		
UPN-28	Sin datos registrados	NPM1, FLT3-ITD, IDH2	89,20
UPN-29	Sin datos registrados	NPM1, FLT3-ITD, STAG2	84,30
UPN-30	Sin datos registrados	NRAS, DNMT3A, FLT3-ITD, NPM1	43,50
UPN-31	46,XX,add(7)(q22),add(12)(p13),-17,+mar,20-60dmin[14]	TP53, DNMT3A	32,80
UPN-32	Sin datos registrados	CALR	19,00
UPN-33	Sin datos registrados	FLT3-ITD, NPM1, TET2, WT1	79,00
UPN-34	46,XY,+Y,der(15;22)(q10;q10)[20]	FLT3-ITD, NPM1, DNMT3A	54,20
UPN-35	46,XX[20]	NPM1, IDH1, GATA2	79,00
UPN-36	47,XY,+8[2]/46,XY[18]	NPM1, FLT3-TKD2, WT1	91,75
UPN-37	Sin datos registrados	RUNX1, CBL, STAG2, TET2	31,25
UPN-38	46,XX[15]	Sin datos registrados	76,10
UPN-39	46,XX,der(3)inv(3)(q21.3q26.2)t(3;14)(q26.2;q31),t(3;14)(q26.2;q31)[15]	KRAS, IKZF1	54,10
UPN-40	46,XX[20]	CEBPA, CSF3R, NRAS, WT1,	55,00

Tabla 3. Características de los pacientes de LMA usados para los estudios ex vivo. En ella se detallan los estudios moleculares y el cariotipo obtenido en el momento del diagnóstico, al igual que los genes que presentan mutaciones y el porcentaje de infiltración de blastos en MO (UPN= Unique patient number)

4.1.4. Animales

Los experimentos relacionados con investigación animal se llevaron a cabo en el Animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) de acuerdo con las normas establecidas por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de los Hospitales Virgen del Rocío y Macarena.

Se utilizaron las siguientes cepas de ratón: BALB/c (H2d), C57BL/6 (H2b) y NSG (NOD/scid/IL-2R sin cadena gamma) de Charles River Laboratories International (L'Arbresle, Francia) y se mantuvieron con alimento y agua ad libitum, en condiciones específicas libres de patógenos. Todos los experimentos comenzaron cuando los ratones tenían entre 8 y 12 semanas de edad.

4.2. Material no biológico

4.2.1. Tratamientos

Reactivos para cultivos celulares	Marca
WIN-55,212-2 mesilato	Tocris Bioscience
Dexametasona	Proporcionada por el Departamento de Farmacia del HUVR
Melfalán	Proporcionado por el Departamento de Farmacia del HUVR
Citarabina (ARA-C)	Proporcionada por el Departamento de Farmacia del HUVR
Miriocina (ISP-1)	Enzo Life Sciences
Fumonisin B1 (FB1)	Enzo Life Sciences
BAF-312	Selleckchem
PF-543	Selleckchem
SKI-II	Selleckchem
FTY-720	Selleckchem
Ponesimod	Selleckchem
Ozanimod	Selleckchem
JTE-013	Selleckchem
ABC294640	Selleckchem
Z-VAD (OMe) -FMK	Abcam
Olaparib	Selleckchem
Mononucleótido de β -nicotinamida (NMN)	Santa Cruz Biotechnology
Glicina	Sigma-Aldrich
Serina	Sigma-Aldrich
Metilpiruvato	Sigma-Aldrich
Dimetilsuccinato	Sigma-Aldrich
Ácido oxalacético (OAA)	Sigma-Aldrich

4.2.2. Medios y soluciones

Reactivos para cultivos celulares	Marca
RPMI	GIBCO® Invitrogen
IMDM	GIBCO® Invitrogen
Penicilina- Estreptomina	GIBCO® Invitrogen
Suero Bovino Fetal (FBS)	GIBCO® Invitrogen
Ficoll-Paque	GE-Healthcare BioSciences
GlutaMax-I 100x	Life Technologies
DMSO	Sigma-Aldrich
Trypan blue	Life Technologies

Reactivos Western blot

- Laemmli buffer (10x)
 - 30,3 gr Trizma (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
 - 144 gr de Glicina (Bio-Rad)
 - 10 gr SDS (PanReac AppliChem, ITW Reagents)
- Loading Sample Buffer (4x)
 - 4,4 ml de Tris (0,5 M, pH 6,8)
 - 4,4 ml de Glicerol (PanReac AppliChem, ITW Reagents)
 - 2,2 ml de SDS (20%)
 - 0,5 ml de Blue Bromoph (1%)
 - 0,48 ml de DTT (1 M)
- TTBS
 - 1 L de TBS (1x)
 - 1 ml Tween® 20 (Sigma-Aldrich)
- TBS (10x)
 - 24 g Tris Base (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
 - 88 g NaCl
 - pH 7,6
- RIPA Buffer
 - 3 ml de cloruro de sodio (5 M)
 - ml de Tris-HCl (1 M, pH 8.0)
 - 1 ml de Nonidet P-40
 - ml de desoxicolato de sodio (10 %)
 - 1 ml de SDS (10 %)
 - Volumen restante hasta 100 ml de ddH₂O

4.2.3. Anticuerpos

Anticuerpos para Western Blot	Marca
Caspasa-2	Abcam
Caspasa-8	Abcam
Caspasa-9	Abcam
Caspasa-3 activa	Abcam
p-Akt	Abcam

p-Erk	Abcam
p-p38MAPK	Abcam
p-JNK	Abcam
SPT	Abcam
CB1	Abcam
CB2	Abcam
Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-xL	Santa Cruz Biotechnology
PARP1	Cell Signaling Technology
Bax	BD Biosciences
Bak	BD Biosciences
AIF	Cell Signalling
beta-actina	Sigma-Aldrich
beta-tubulina	Sigma-Aldrich
Anticuerpos secundarios conjugados con HRP mouse	Jackson ImmunoResearch
Anticuerpos secundarios conjugados con HRP rabbit	Jackson ImmunoResearch

Anticuerpos monoclonales de FACS	Fluorocromo	Marca
Para ratón		
B220	FITC	Immunostep
B220	PE	BD Pharmingen
CD11b	FITC	Immunostep
CD11b	PE	Immunostep
CD11c	FITC	Immunostep
CD127	BV510	BD Biosciences
CD16/32	V450	BD Biosciences
CD3	FITC	eBioscience
CD3	PerCP Cy5	BD Pharmingen
CD34	APC	eBioscience
CD4	FITC	Immunostep
CD4	APC	BD Biosciences
CD45	APC	BD Biosciences
CD8	FITC	BD Biosciences
CD8	PE	Immunostep
C-Kit	PerCP Cy5	BioLegend
FLT3	PE	Immunostep
GR1	FITC	Immunostep
IgM	APC	BD Biosciences
Scal	PE Cy7	BD Biosciences
Ter119	FITC	Immunostep

Anticuerpos monoclonales de FACS	Fluorocromo	Marca
Para humano		
7-aminoactinomicina D (7-AAD)	PerCP Cy5	BD Biosciences
Annexin V	PE	BD Pharmingen
CD45	CF-Blue	Immunostep
CD117	PE-Cy7	BD Pharmingen
CD19	APC-Cy7	BD Pharmingen
CD3	FITC	BD Pharmingen
CD33	APC	BD Pharmingen
CD34	FITC	BD Biosciences
HLA-DR	V450	BD Biosciences
CD138	FITC	BD Pharmingen
CD64	PerCP Cy5	BD Pharmingen
CD34	APC	BD Pharmingen
CD56	PE	Immunostep
CD38	FITC	BD Biosciences

4.2.4. Kits actividad enzimática

Kit actividad enzimática	Marca
Hexokinase Colorimetric Assay kit (K789-100)	Biovision
Phosphoglucose Isomerase Activity Colorimetric Assay Kit (K775-100)	Biovision
Phosphofruktokinase (PFK) Activity Colorimetric Assay Kit (K775-100)	Biovision
Aldolase Activity Colorimetric Assay Kit (K665-100)	Biovision
Enolase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (K691-100)	Biovision
GAPDH Activity Assay Kit (K680-100)	Biovision
Phosphofruktokinase (PFK) Activity Colorimetric Assay Kit (K776-100)	Biovision
Phosphoglucose Isomerase Activity Colorimetric Assay Kit (K775-100)	Biovision
Pyruvate Kinase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (K709-100)	Biovision
Triose Phosphate Isomerase (TPI) Activity Colorimetric Assay Kit (K670-100)	Biovision
Phosphoglycerate Kinase Activity Assay Kit (Colorimetric) (K194-100)	Biovision

4.2.5. Programas informáticos

Software	Marca
Infinicyt 2.0	Cytognos
FlowJo v10	BD Biosciences
Prism 7	GraphPad

BioRender
 Transcriptome Analysis Console (TAC)
 Seahorse Wave Desktop Software
 SDS v2.4
 ImageLab
 Adobe Photoshop
 Adobe Illustrator
 Image J
 CalcuSyn

BioRender
 Thermo Fisher
 Agilent
 Thermo Fisher
 Bio-rad
 Adobe
 Adobe
 National Institute of Mental
 Health
 Biosoft

4.3. Métodos

4.3.1. Estudios de viabilidad celular y apoptosis in vitro.

4.3.1.1. Obtención y cultivo de células primarias de pacientes y donantes sanos

Las médulas óseas de los pacientes con MM y LMA se diluyeron en suero fisiológico a una proporción 1:4 y se separó la fracción mononucleada mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (1600 rpm durante 25 minutos). Tras la centrifugación, se recogió la interfase que contiene las células mononucleadas con pipetas Pasteur estériles tal como se muestra en la figura 15.

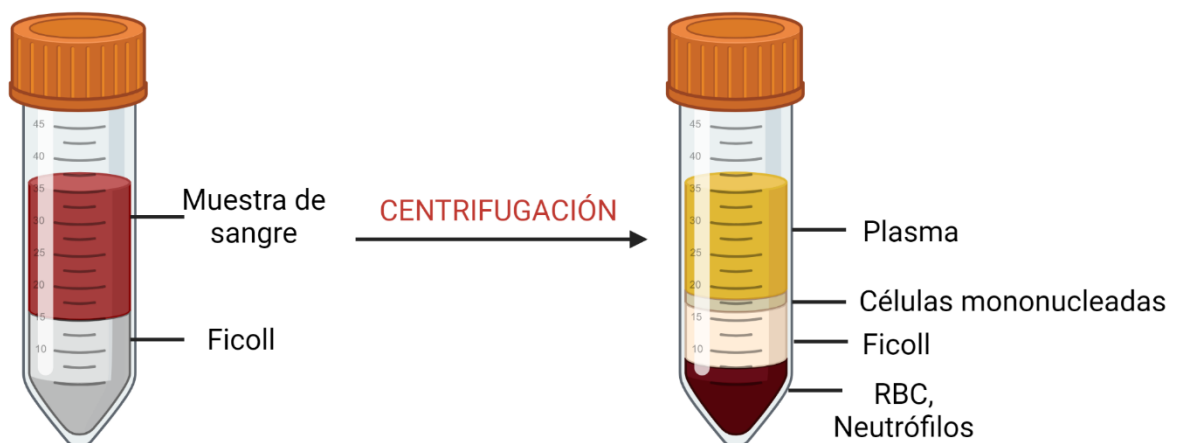


Figura 15. Esquema de las distintas fases obtenidas tras centrifugación por gradiente con Ficoll.

Posteriormente, se lavaron 2 veces con medio RPMI suplementado con 1% de antibiótico a 1200 rpm durante 10 minutos. Tras el segundo lavado, retiramos el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI. Luego, se procedió al recuento celular mediante cámara de Neubauer o contador celular Mythic 18 Vet (Orphée, Geneva, Plan-lesOuates, Switzerland).

Para los concentrados leucoplaquetarios o buffy coat se siguió el mismo protocolo, aunque la proporción de dilución con suero fisiológico fue de 1:8.

En el caso de las leucoaféresis, se realizaron 2 lavados con medio RPMI suplementado con 1% de antibiótico antes del uso de las células totales de la muestra.

Hay que destacar que para los estudios con cannabinoides se usaron medios de cultivos sin SBF, ya que hay evidencias de que este puede interactuar con estos compuestos bloqueando en parte su acción.(Jacobsson et al., 2000)

Como medida especial, durante la pandemia por Covid-19 se exigió que las células primarias usadas fueran de pacientes con una PCR negativa previa a su extracción o en caso de no tenerla, se le realizó a la muestra una PCR en el Servicio de Genómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla antes del uso de las mismas.

4.3.1.2. Ensayo de proliferación “Cell Counting Kit-8 (CCK-8)”

4.3.1.2.1. Líneas celulares

Las líneas celulares estudiadas se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (50.000 células/pocillo) en un volumen final de 100 µL de medio, ya sea IMDM o RPMI según la línea celular, evitando usar los pocillos de los bordes de la placa cuya deshidratación puede influenciar los resultados.

Las dosis usadas y tiempo de incubación con los fármacos se detallan en cada experimento. En los experimentos de tratamientos de cannabinoides combinados con

inhibidores o antagonistas, estos últimos se administraron 1 hora antes a menos que se detalle lo contrario.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico usando el reactivo Cell Counting Kit-8 (CCK-8) según las instrucciones del fabricante para la determinación de la viabilidad celular en ensayos de proliferación celular y citotoxicidad. Este kit se basa en la reducción de la sal de tetrazolio WST-8 mediante las actividades deshidrogenasas de las células, para formar el colorante formazán de color amarillo. La cantidad de colorante formazán, es directamente proporcional al número de células vivas. Elegimos este kit ya que la sensibilidad de detección de CCK-8 es más alta que las otras sales de tetrazolio como MTT, XTT, MTS o WST-1. Las densidades ópticas se midieron a 450 nm usando un lector de placas Multiskan™ Go Microplate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Cada condición se sembró por triplicado en la placa de 96 pocillos y se realizaron al menos 3 experimentos independientes en cada caso.

4.3.1.2.2. Células sanas

Para los estudios de viabilidad en células sanas, se aisló cada población de interés antes de sembrarla. Para ello, las células HSC (CD34⁺) provenientes de la leucoaféresis se aislaron usando el kit de aislamiento celular de Myltenyi basado en bolas magnéticas conjugadas con anti-CD34. El mismo proceso se llevó a cabo con las células mononucleadas provenientes del buffy coat para aislar los linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos B (CD19⁺) usando los kits con bolas magnéticas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD19 respectivamente.

Se realizó el protocolo recomendado por el fabricante para cada uno de los kits y, una vez obtenidos las poblaciones celulares puras se procedió a sembrarlas en las mismas condiciones que las líneas celulares.

En el caso de las células primarias tanto sanas como patológicas, el tiempo máximo de incubación con el fármaco fue de 18 horas, ya que fue el tiempo máximo al que no observamos muerte celular en las condiciones controles al usar un medio sin suplemento de suero o citoquinas adicionales.

4.3.1.3. Estudios de sinergismo

La evaluación del sinergismo entre el cannabinoide WIN-55 y otros fármacos utilizados en el mieloma múltiple o en la LMA, como dexametasona, melfalán o citarabina, se realizó evaluando la viabilidad celular mediante ensayos con Cell Counting Kit-8. La eficacia de la combinación se cuantificó con el Software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO), que se basa en el método de Chou Talalay y calcula un índice de combinación (CI), donde los valores de CI entre 0 y 0,9 se asocian a sinergismo, los valores entre 0,9 y 1,1 a aditividad y los mayores a 1,1 a antagonismo (Chou, 2010).

4.3.1.3. Estudios de viabilidad por FACS

4.3.1.3.1. Líneas celulares

Los estudios de viabilidad por citometría de flujo se realizaron usando el kit de Anexina V / 7AAD, según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences).

Este kit se basa en la detección del fosfolípido fosfatidilserina, que se transloca desde el interior al exterior de la membrana plasmática en células apoptóticas, exponiéndose así al entorno celular externo, a la vez que se forman poros en la misma. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos que tiene una alta afinidad por la

fosfatidilserina y se une a las células con esta expuesta, mientras que la 7AAD es un compuesto químico fluorescente con una fuerte afinidad por el ADN, que se une a este cuando la membrana plasmática está dañada. De esta forma, las células viables serían Anexina V⁻/7AAD⁻, las que entran en apoptosis temprana serían Anexina V⁺/7AAD⁻ y las células muertas Anexina V⁺/7AAD⁺.

Tras la tinción con estos compuestos se analizó las muestras en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizó con el software FlowJo.

Para este estudio se sembraron 100.000 células por condición en un volumen final de 200 µL de medio en placas de 96 pocillos con fondo curvo, que fueron usadas directamente para realizar el marcaje con la 7AAD y la Anexina V y se usó como soporte para la adquisición de células en el citómetro usando el adaptador para placa.

4.3.1.3.2. Células primarias

En el caso de células primarias, ya sean normales, de MM o LMA, se sembraron las células mononucleares o de leucoaféresis totales sin seleccionar previamente. En este caso, se sembraron 1×10^6 células por condición siempre que la cantidad de muestra lo permitió (en el caso que la cantidad no fuese suficiente se adaptó el número de células a las condiciones propuestas para el estudio).

Para analizar la viabilidad celular de la población de interés, el marcaje específico para cada una de ellas se incluyó junto al marcaje con 7AAD y Anexina V. Las células plasmáticas mielomatosas se identificaron usando una combinación de anticuerpos (CD138, CD64, CD34, CD56, CD38, y CD45) como muestra la estrategia de análisis resumida en la Figura 16.

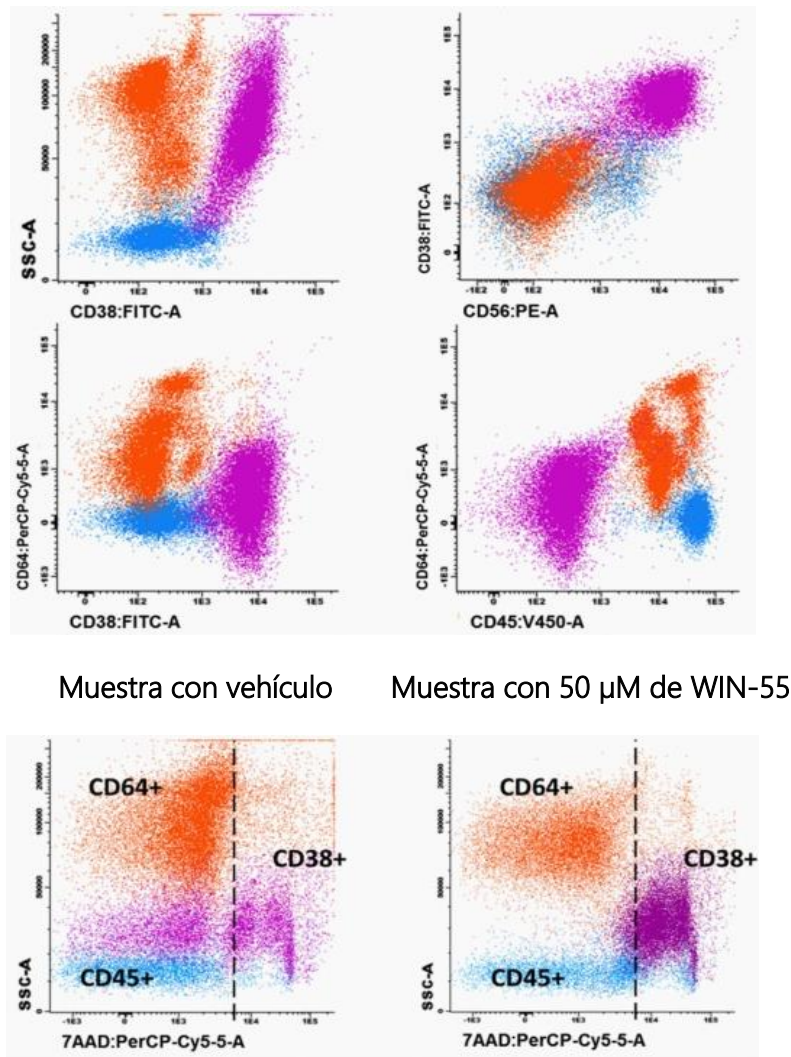


Figura 16. Identificación de células plasmáticas mielomatosas en muestras de MO de pacientes con MM.

Los blastos provenientes de la MO de pacientes con LMA se identificaron con la combinación de anticuerpos monoclonales contra los antígenos asociados a estas células en el momento del diagnóstico (CD33, CD34, CD117, HLA-DR y CD45) como se muestra en la Figura 17.

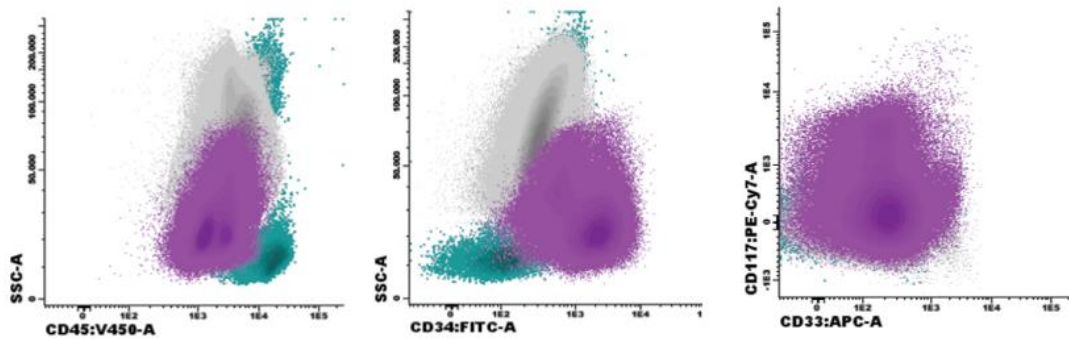


Figura 17. Identificación de blastos prodecentes de MO de pacientes con LMA

En el caso de las células provenientes del buffy coat, la viabilidad celular de los linfocitos T y B se estudió usando una combinación de anticuerpos contra CD45, CD3 y CD19 como se muestra en las gráficas de la Figura 18.

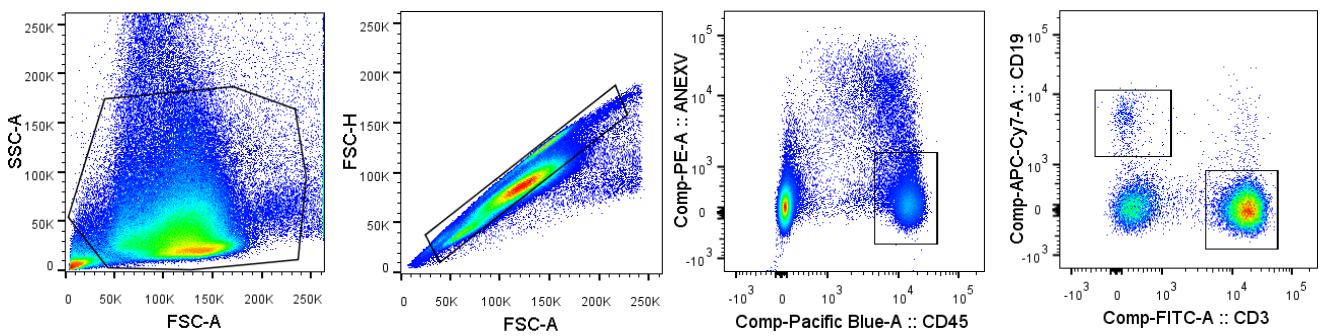


Figura 18. Identificación de linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos B (CD19⁺) por FACS procedentes de buffy coats de donantes sanos en condiciones control.

Por último, para la identificación de las HSC se realizó un marcaje contra CD45 y CD34 (Figura 19).

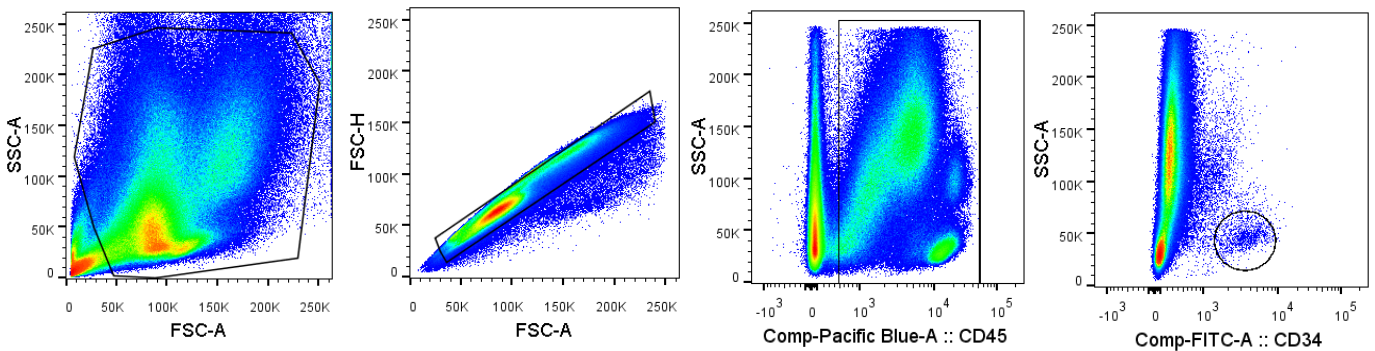


Figura 19. Identificación de HSC (CD34⁺) por FACS procedentes de leucoaféresis de donantes sanos en condiciones control.

4.3.1.4. Ensayo clonogénico a partir de células aisladas

Este estudio se realizó a partir de líneas celulares previamente sorteadas en el separador celular FACS Fusion, de manera que se sembró una única célula por pocillo en placas de 96 pocillos para cada una de los tratamientos. Pasados 10 días se realizó el recuento de colonias crecidas a partir de dicha célula en cada condición y se comparó con el número de colonias crecidas en la condición control.

4.3.2. Modelos murinos

4.3.2.1. Estudio de citotoxicidad en ratones sanos

Para el estudio del efecto de los cannabinoides sobre la hematopoyesis normal de ratones BALB/c sanos se trataron con la dosis de WIN-55 de 5 mg/kg/día durante 7 y 28 días. También se realizó estos estudios en combinación con G-CSF, donde los ratones sanos recibieron durante 3 días una inyección intraperitoneal de G-CSF (150 µg/kg/día) más vehículo ó de G-CSF (150 µg/kg/día) en combinación con WIN-55 (5 mg/kg/día). WIN-55 o el vehículo se administraron los 4 días adicionales hasta llegar al día 7.

Posteriormente, las distintas poblaciones celulares de MO, SP y bazo se analizaron mediante citometría de flujo y ensayos de recuento sanguíneo, como se muestra en la figura resumen del experimento (Figura 20):

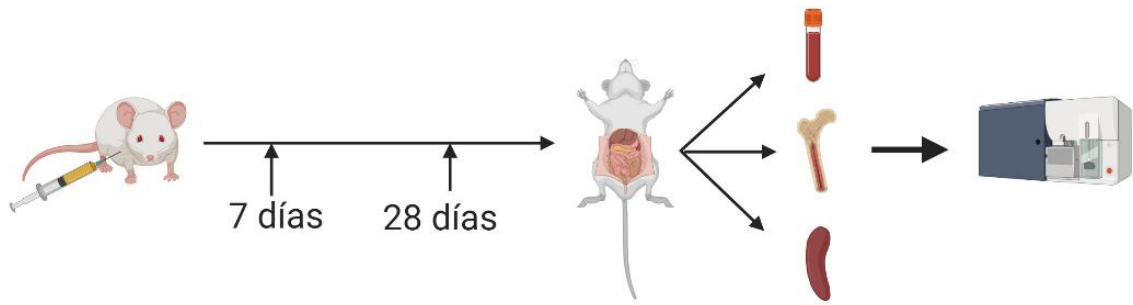


Figura 20. Resumen estudio citotoxicidad en ratones sanos

4.3.2.1.1 Análisis de poblaciones en sangre periférica y hematimetría

Para el análisis de las células sanguíneas, la sangre periférica se recolectó mediante punción cardiaca utilizando jeringuillas previamente heparinizadas, en tubos de 1 mL (MiniCollect 1 mL K3EDTA, Grenier Bio-One, Kremsmünster, Austria) en el momento del sacrificio. Las células se cuantificaron en el contador automático Mythic 18 Vet (Orphée, Geneva, Plan-lesOuates, Switzerland).

Para la determinación de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo, 100 μ L de sangre se marcaron con los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente, y los glóbulos rojos maduros se lisaron mediante una solución comercial de lisis de glóbulos rojos.

4.3.2.1.2. Análisis de progenitores hematopoyéticos en MO

Una vez sacrificado el animal mediante dosis letales de anestésico (Tiobarbital Braun 0,5; 200 μ L para un animal de 25gr) se accedió a los huesos de las patas traseras con material quirúrgico. Los huesos se extrajeron y se sumergieron en PBS antes de terminar de limpiarlos con una gasa. La solución celular se obtuvo mediante el lavado con PBS+10%FBS a presión por el canal medular de los huesos usando agujas de 25G, se filtró usando filtros de 40 μ m de tamaño de poro y se lavaron con PBS centrifugando a 1200 rpm durante 5 minutos.

Para la identificación de las poblaciones celulares maduras de la médula ósea se usó un coctel de anticuerpos conjugados en FITC formados por anti-CD3, -CD4, -CD8, -B220, -CD11b, -CD11c, TER119, -GR-1. Una vez se seleccionó la fracción más inmadura (Lin^-), correspondiente al aproximadamente 3% del total de células de la médula, se usaron otros anticuerpos como son el CD16/32, CD34, c-KIT, Sca-I, Flt-3 y CD127. La estrategia de análisis seguida para la identificación de cada población fue la siguiente:

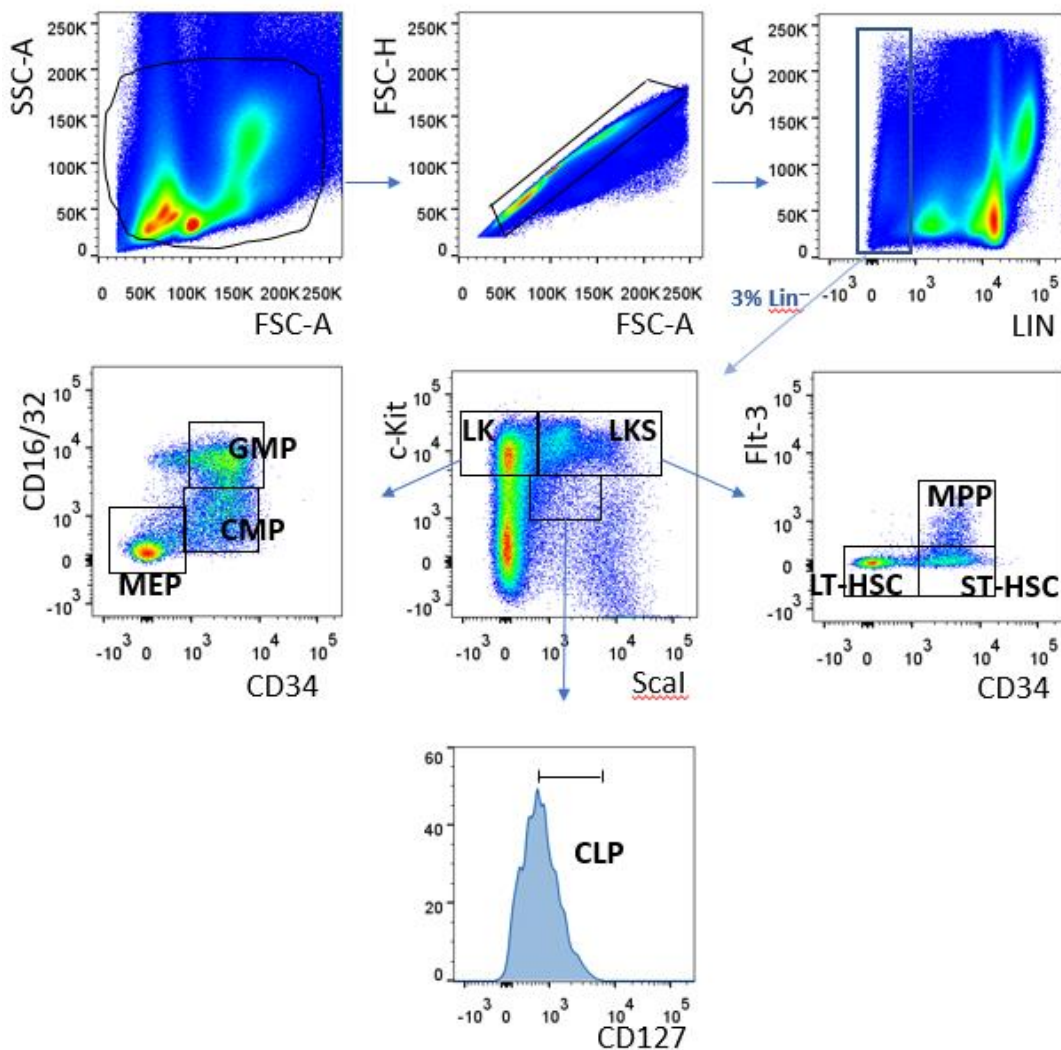


Figura 21. Identificación de progenitores hematopoyéticos en MO. Se estudiaron las subpoblaciones de LKS (poblaciones de HSC a largo plazo (LT-HSC), HSC a corto plazo (ST-HSC) y progenitor multipotente (MPP)), subpoblaciones de LK (progenitor mieloides común (CMP),

progenitores de megacariocitos / eritrocitos (MEP) y Poblaciones de progenitores de granulocitos / macrófagos (GMP) y CLP (progenitor linfoide común).

4.3.2.2. Modelo murino de MM

4.3.2.2.1. Desarrollo del modelo

Los ratones de 8 semanas de vida NOD/Scid/IL-2R gammae null (NSG) se trasplantaron con xenoinjertos tumorales por vía subcutánea mediante una inyección de 5×10^6 de células U266 mezcladas con 100 μ L de Matrigel (BD Biosciences). Cuando los tumores se hicieron palpables ($> 0,5$ cm), los ratones se asignaron al azar en los siguientes grupos (10 ratones por grupo): (i) 5 mg/kg WIN-55,212-2 cada 24 horas, (ii) 5 mg/kg WIN-55,212-2 cada 48 horas, y (iii) vehículo a los 2 tiempos usados. Como control negativo usamos un grupo de animales libres de tumores, y otro grupo inoculados con 100 μ L de Matrigel y recibieron el fármaco cada 24 o 48 h, respectivamente. Todos los tratamientos descritos se inyectaron por vía intraperitoneal.

4.3.2.2.2. Monitorización del crecimiento del tumor

El crecimiento tumoral se evaluó diariamente midiendo el diámetro con un calibre. El volumen se calculó mediante la fórmula: $(\text{largo}) \times (\text{ancho})^2 \times 0.4 \text{ mm}^3$. Los animales se sacrificaron cuando la longitud o el ancho del tumor alcanzó 2 cm.

4.3.2.3. Modelo murino de LMA

4.3.2.3.1. Generación de la línea celular HL60 que sobreexpresa el gen de la luciferasa

Las células HL60 se infectaron con partículas lentivirales que portan la construcción pCMV-Luc2-IRES-GFP, el cual se muestra en la Figura 22, la cual permite la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga y la proteína verde fluorescente GFP. Para la producción de estas partículas lentivirales, la línea celular comercial Lenti-X

derivada de 293-T se transfectó con el vector lentiviral pCMV-Luc2-IRES-GFP y los vectores de empaquetamiento viral psPax2 y pVSV-G en una proporción 1: 1: 1 usando el método PEI. 48 h tras la transfección, los sobrenadantes virales se recogieron y se ultracentrifugaron para concentrar las partículas. Las células HL60 se infectaron a un MOI de 5, incubando las células con el virus en presencia de Polibreno (8 µg / mL) durante 24 h. Las células HL60 GFP⁺ se seleccionaron mediante el separador celular FACS Jazz.

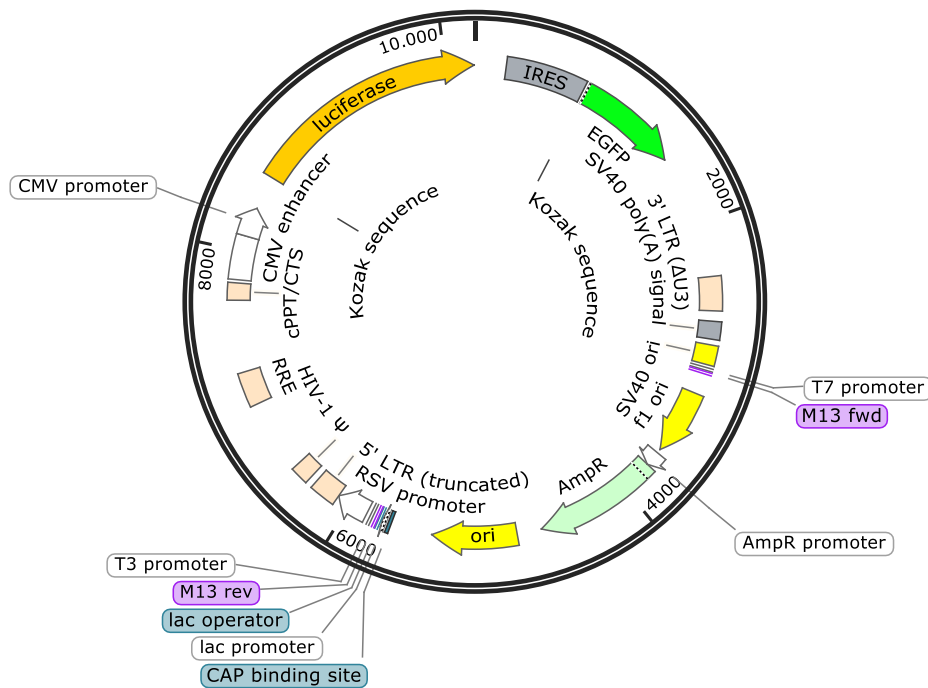


Figura 22. Esquema de la construcción usada para la generación de células HL60-Luciferasa.

4.3.2.3.2. Desarrollo del modelo de xenoinjerto murino con HL60

Los ratones NSG de entre 8 y 12 semanas de edad se irradiaron a 300 cGy procedente de una fuente de Cesio 137, entre 4 y 8 horas antes del xenoinjerto. Se inyectaron 5×10^6 células HL60 o 2×10^6 células HL60-Luciferasa resuspendidas en 100 µL de medio RPMI sin SBF por la vena de la cola, mediante inmovilización en cepo, y

dilatación de la vena de la cola por calor. Tras la inyección, se monitorizaron a los ratones periódicamente para seguir la progresión de la enfermedad controlando la pérdida de peso y la detección de células CD45⁺ humanas en la MO de ratón (mediante aspirados y ensayos de citometría de flujo en el caso del modelo con células HL60 o bioluminiscencia en el caso de HL60-Lucifera).

Una vez confirmada la presencia de células leucémicas, el tratamiento con vehículo, cannabinoide WIN-55 a una dosis de 5 mg/kg/día o citarabina (ARA-C) a una dosis de 50 mg/kg se administró durante 5 días como muestra la figura 23.

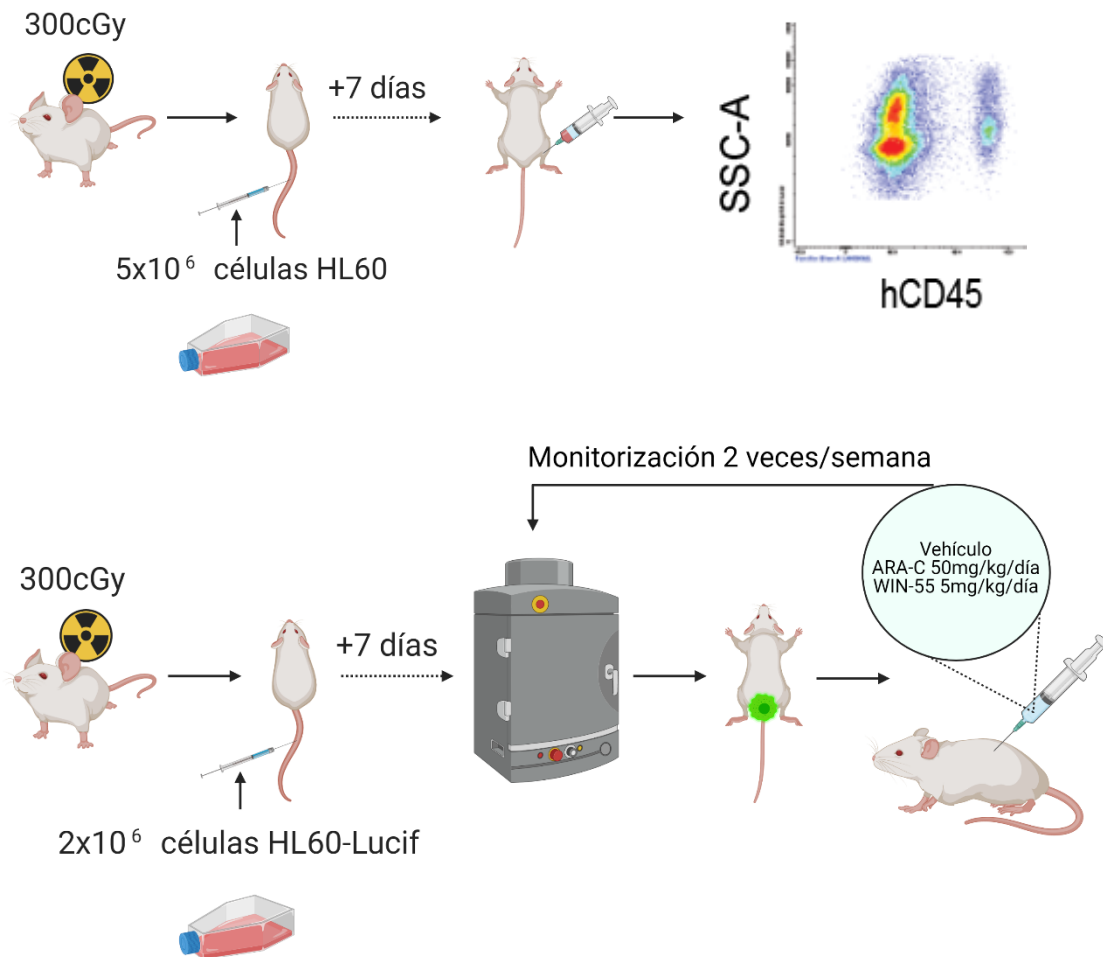


Figura 23. Resumen del experimento realizado con el modelo in vivo de LMA para generar xenoinjertos con la línea celular HL60 y HL60-Lucif.

4.3.2.3.3. Estudio de progresión de la enfermedad.

Para el estudio del efecto del fármaco en los primeros estadios de la enfermedad en este modelo (5 días) se inyectó células HL60-Luciferasa a un grupo de ratones (n=7 por cada condición), y cuando se confirmó la infiltración de las células por bioluminiscencia se trataron con vehículo y 5mg/kg/día de WIN-55 durante 5 días. Transcurrido este tiempo, los ratones se sacrificaron y se analizó el tamaño del bazo y la infiltración de células CD45⁺ humanas en sangre periférica (SP), bazo y médula ósea (MO) después de esos 5 días de tratamiento.

4.3.3. Extracción de ARN y PCR Cuantitativa

El ARN total se aisló utilizando el kit de QIAamp RNA Blood Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se generó a partir de 2 mg de ARN total usando SuperSript IV VILO System (Invitrogen). Se utilizó una solución de ADNc (diluida 1:10; 2 ml) como plantilla para la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Los productos génicos se cuantificaron mediante qPCR con el sistema de PCR en tiempo real 7500 FAST de Applied Biosystems. Los valores se normalizaron a la expresión del gen ABL humano. Cada experimento se realizó por triplicado. La secuencia de oligonucleótidos de ABL y sondas Taqman utilizadas se tomaron de la literatura (Gabert et al., 2003) y se enumeran a continuación:

Fw ABL (ENF1003): 5'TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T 3'

RV ABL (ENR1063): 5'GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA 3'

ABL sonda (ENP541): 5'CCC TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG A 3'

Las sondas TaqMan CNR2 Hs00275635_m1 y CNR1 Hs00275634_m1 (ThermoFisher Scientific) se utilizaron para la expresión de los genes CB2 y CB1, respectivamente.

4.3.4. Microarrays

Para estudiar la diferencia de expresión de genes, 1×10^6 células HL60 se trataron con WIN-55 (50 μ M) o con su respectivo vehículo durante 6 horas. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS frío, para descartar restos del tratamiento y el ARN se extrajo usando el kit de extracción de ARN de Qiagen siguiendo las indicaciones del proveedor.

Una vez extraído, el ARN fue cedido al Servicio de Genómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), donde se amplificó y se marcó utilizando el kit de reactivos GeneChip® WT PLUS (Thermo Fisher Scientific, Inc.) La amplificación se realizó con 100 ng de ARN total siguiendo los procedimientos descritos en el manual del usuario del kit. El ADNc amplificado se cuantificó, fragmentó y marcó para realizar la posterior hibridación con GeneChip® Clariom S Human Array (Thermo Fisher Scientific, Inc.) utilizando 5,5 μ g de producto de ADNc monocatenario y siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario. El lavado, la tinción (GeneChip® Fluidics Station 450, Thermo Fisher Scientific, Inc.) y el escaneo (GeneChip® Scanner 3000, Thermo Fisher Scientific, Inc.) se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario para matrices de cartuchos.

4.3.5. Estudios de expresión de proteínas

4.3.5.1. Western blot

Para el estudio de expresión de proteínas de interés mediante WB, la línea celular HL60 se incubó con una concentración de 50 μ M de WIN-55 o su correspondiente vehículo a diferentes tiempos de incubación (0, 2, 6, 18 y 24 h de tratamiento). Las células se lisaron de acuerdo con Gilbert et al. (Gilbert et al., 2002), usando un buffer de lisis compuesto por 20 mM de tampón Tris-HCl (pH 7.3), conteniendo además DTT (2 mM), ASB (1%), NP-40 (1%), NaCl (150 mM), Na_3VO_4 (1

mM), NaF (10 mM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 10% de cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Mannheim, Germany) en los casos en los que se estudió proteínas de membranas, o se lisaron con RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y nucleasas en el resto de casos.

Las muestras se incubaron 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 15 minutos. Los sobrenadantes se recogieron y la concentración de proteínas se cuantificó utilizando el Kit BCA (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rocford, IL, USA). Los extractos de proteínas (15-30 µg) se separaron mediante electroforesis SDS/PAGE en geles prefabricados AnykD Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Polyacrylamide Gels SDS (Bio Rad, Hercules, CA) usando un amperaje constante de 20 Amperios/ gel y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando el sistema Trans-BlotVR Turbo™ (Bio-Rad). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (2% de BSA, Tween-20 al 0.1% en TBS ó TTBS) seguido de una incubación durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de interés. Al día siguiente, se retiró los anticuerpos primarios y tras varios lavados con TTBS se procedió a incubar 1-2 horas con el anticuerpo secundario adecuado. Luego se realizaron varios lavados con TTBS para eliminar los restos de anticuerpo secundario y un último lavado con TBS antes de proceder a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia.

La detección de los anticuerpos se realizó por quimioluminiscencia con las soluciones del Western blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology) en ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad) y el análisis de las imágenes y la cuantificación/normalización de la proteína con en el software Image Lab (Bio-Rad).

Para el estudio de la expresión de AIF en diferentes localizaciones celulares, realizamos además un subfraccionamiento celular previo al Western blot para evaluar la expresión de dicha proteína en el citoplasma, mitocondria y núcleo celular.

Tras realizar un pretratamiento con Olaparib, y posteriormente un tratamiento de 6 o 18 horas con WIN-55 a una dosis de 50 μ M, se recogieron las células y lavaron en 10 mL de PBS frío centrifugando a 1200 r.p.m durante 10 minutos. Para la purificación de mitocondrias se usó el kit de aislamiento de mitocondrias Thermo Scientific para células cultivadas, mientras que para el citoplasma y núcleo se usó el kit de fraccionamiento subcelular de proteínas para células cultivadas de Thermo Scientific siguiendo las indicaciones del fabricante en ambos casos.

4.3.5.2. Inmunofluorescencia

Las células tratadas con WIN-55 durante 2 y 6 horas se recogieron y se colocaron en portaobjetos. En el caso de las ceramidas, la tinción por inmunofluorescencia se realizó como describieron previamente Vielhaber et al. (Vielhaber et al., 2001) utilizando anti-ceramida como anticuerpo primario. El anticuerpo para la ceramida se obtuvo de Sigma-Aldrich. El anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 era de Abcam. Con respecto a la condición de control, las células se trataron con DMSO (<0,15%) en medio RPMI 1640 de Gibco (Gaithersburg, MD).

Para la determinación de los niveles de ser139-H2AX o de poly(ADP)ribosilación, las células se centrifugan, se lavan con PBS, se fijan en una solución de PBS +formaldehído 4% y se permeabilizan en PBS+0.2% triton-X-100 durante 2 minutos. Las células se lavan con PBS, se bloquean en solución de bloqueo (PBS + 3% FBS) durante 30 min, y se incuban posteriormente con los anticuerpos primarios de interés (anti ser139-H2AX ó

anti PAR) diluidos 1:1000 en solución de bloqueo durante 1 h. Tras la incubación, las células se lavan 3 veces con PBS + 0.25% Tween-20 durante 5 min cada una. Tras los lavados, las células se incuban con el anticuerpo secundario (1:5000 en solución de bloqueo) durante 1,5 horas. Trascorrido el tiempo de incubación, las células se lavan tres veces en PBS + 0.25% Tween-20 durante 5 min cada una. Finalmente, las células se montan en portaobjetos usando medio de montaje Prolong conteniendo DAPI.

4.3.6. Estudios de daño mitocondrial

4.3.6.1. Análisis del potencial de membrana mitocondrial

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se evaluó mediante marcaje con TMRE de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las líneas celulares U266, HL60 y U937 se expusieron a 50 μM de WIN-55 durante 15, 30, 45 y 60 min y luego se incubaron durante 20 min a 37°C con TMRE, que se acumula en las mitocondrias activas. La tinción de TMRE se analizó a 549/575 nm (Ex/Em) mediante espectrofotometría de fluorescencia en microplacas. Se utilizó cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP) como control para inducir la pérdida de $\Delta\Psi_m$.

4.3.6.2. Estudio de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las células tratadas con WIN-55 (50 μM) (10^6 células/ensayo) ó con el vehículo respectivo se incubaron durante 15 ó 30 minutos a 37°C, y se tiñeron con la sonda MitoSOX [Molecular Probes (Invitrogen)] a una concentración de 5 μM para detectar el superóxido mitocondrial. La señal de MitoSOX se detectó mediante citometría de flujo según recomendaciones del fabricante.

4.3.7. Estudios metabólicos

4.3.7.1. Cuantificación de ceramidas

Las líneas celulares HL60, KG-1a y U937 (20×10^6 células/condición) se trataron con WIN-55 (50 μ M) y/o inhibidores de ceramidas durante diferentes períodos de tiempo y los lípidos se extrajeron con una solución 2:1 de cloroformo / metanol (Folch et al., 1987).

En los extractos clorofórmicos de los lisados celulares se incluyeron patrones internos (20 μ L) de C17:0 y se secaron bajo una corriente constante de nitrógeno a temperatura ambiente.

Las muestras reconstituidas se analizaron utilizando un sistema de cromatografía líquida Agilent (Serie 1200) que consta de una bomba binaria (G1312A), conectada a un espectrómetro de masas API 2000 de triple cuadrupolo (Applied Biosystems) utilizando una interfaz de ionización por electropulverización en modo de ionización positiva (ESI+). Las distintas ceramidas se separaron en una columna Zorbax Eclipse XDB-C1 de Agilent. Los iones precursores y del producto se usaron con fines de cuantificación y confirmación, y las condiciones de funcionamiento se resumen en la Tabla 4.

Ceramida	Transición observada	DP	FP	EP	CE	CXP
14:0	492.5 \rightarrow 264.3	86	370	8	31	6
	492.5 \rightarrow 82.2	86	370	8	69	2
	492.5 \rightarrow 56.1	86	370	8	69	6
16:0	520.5 \rightarrow 264.2	121	370	9	33	6
	520.5 \rightarrow 82.2	121	370	9	69	2
	520.5 \rightarrow 55.0	121	370	9	95	6
18:0	548.6 \rightarrow 264.4	86	370	9	37	6
	548.6 \rightarrow 82.0	86	370	9	83	8
	548.6 \rightarrow 55.0	86	370	9	97	6
18:1	546.5 \rightarrow 264.3	106	370	8.5	37	6
	546.5 \rightarrow 82.2	106	370	8.5	75	2
	546.5 \rightarrow 55.1	106	370	8.5	101	6
20:0	225.2 \rightarrow 55.1	31	360	10	53	6
	225.2 \rightarrow 61.1	31	360	10	35	8

	225.2 → 100.2	31	360	10	23	4
22:0	604.5 → 264.3	136	370	12	35	6
	604.5 → 82.2	136	370	12	87	2
	604.5 → 55.1	136	370	12	111	6
24:0	632.5 → 264.3	146	250	11	37	6
	632.5 → 82.2	146	250	11	91	2
	632.5 → 55.1	146	250	11	109	6
24:1	630.5 → 264.2	136	370	9.5	45	8
	630.5 → 82.2	136	370	9.5	75	0
	630.5 → 67.0	136	370	9.5	123	0
17:0 (IS)	534.4 → 264.3	101	370	10	37	6
	534.4 → 82.2	101	370	10	77	2
	534.4 → 55.1	101	370	10	103	6

Tabla 4. Optimización de las transiciones MRM para la detección de ceramidas. (DP: declustering potential; FP: focusing potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: cell exit potential; IS: Internal Standard).

4.3.7.2. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de acidificación extracelular (ECAR)

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) de las células U937, HL60 y CD34⁺ humanas se determinó utilizando un analizador Seahorse XFp (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos). Los cartuchos del sensor XFp (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos) se hidrataron durante la noche anterior con 200 μ L de ddH₂O a 37 °C en un incubador sin CO₂. Dos horas antes de su uso, el ddH₂O se retiró y se añadió 200 μ L de la solución calibrante XF (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos) y se incubó a 37 °C en un incubador sin CO₂.

Brevemente, las líneas celulares U937 y HL60 se trataron con: i) vehículo, ii) WIN-55 100 μ M durante 30 min o iii) Olaparib 10 μ M durante 1 h y WIN-55 100 μ M durante 30 min. Las células humanas primarias CD34⁺ se trataron con WIN-55 (100 μ M) y se sembraron 3x10⁵, 4x10⁵ y 3x10⁵ células, respectivamente, en 180 μ L de medio Eagle modificado de Dulbecco (XF DMEM) en cada pocillo de la placa de cultivo celular de Seahorse de 8

pocillos, y se dejaron en reposo durante 30 min antes del análisis. Las mediciones de oxígeno y protones se realizaron durante 110 min, siguiendo el protocolo programado. También se determinó la tasa de consumo de oxígeno basal y la tasa de acidificación extracelular basal. Además, las lecturas de OCR y ECAR se normalizaron por millón de células.

- **Prueba de Mitostress**

La función mitocondrial se analizó mediante inyecciones secuenciales de oligomicina (2,5 μM), para bloquear la respiración acoplada a ATP; Cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP, 0,3 μM), para desacoplar la cadena respiratoria y asegurar una respiración máxima completa; y 0,5 μM de rotenona + antimicina A (Rot / AA), para bloquear la respiración mitocondrial.

Para esta prueba, se utilizó XF DMEM suplementado con L-glucosa 10 mM y L-glutamina 2 mM para células U937 y CD34⁺ humanas, y con L-glucosa 21 mM y L-glutamina 2 mM para células HL60.

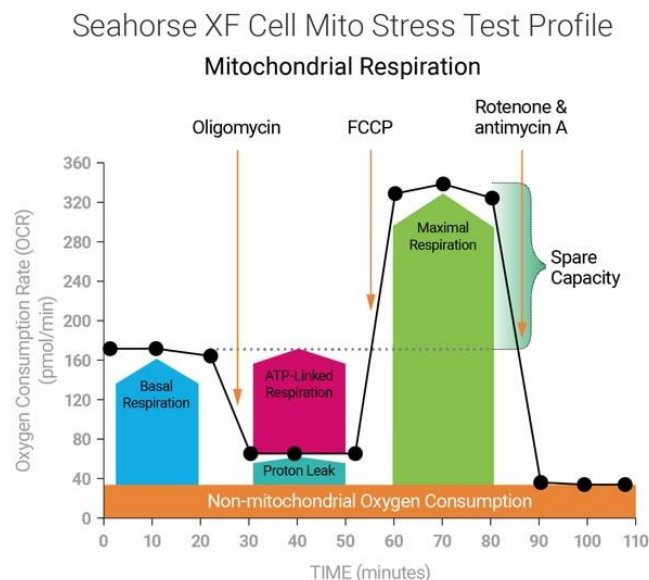


Figura 24. Esquema resumen del funcionamiento del ensayo para medir la función mitocondrial usando el kit Mito Stress Test para el analizador Seahorse XF de Agilent (Imagen tomada de la web de Agilent Technologies, Inc.).

- Test de estrés glucolítico

Para el test de estrés glucolítico, las células se trataron con inyecciones secuenciales de glucosa 5 mM (10 mM en total), para forzar el proceso glucolítico celular; y 2-desoxiglucosa (2-DG) 100 mM, para inhibir la glucólisis. Para esta prueba, se usó XF DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM.

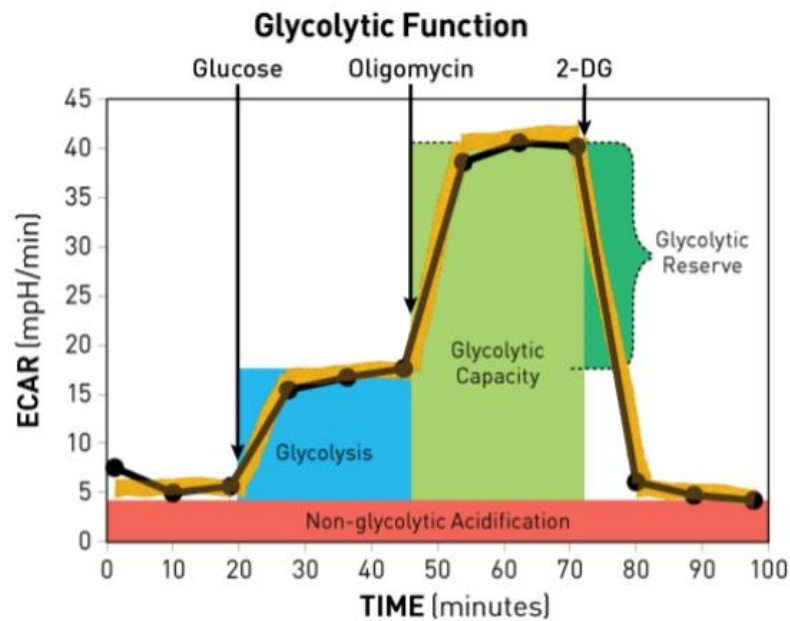


Figura 25. Esquema resumen del funcionamiento del ensayo para medir la función glucolítica usando el kit Glycolysis stress test para el analizador Seahorse XF de Agilent. En nuestro abordaje se ha obviado el uso de Oligomicina porque solo queríamos estudiar la glucólisis y no la capacidad glucolítica. (Imagen tomada de la web de Agilent Technologies, Inc.).

- Interpretación de los resultados

Las mediciones del analizador de flujo se realizaron por duplicado para las células U937 y HL60, y por triplicado para las células CD34⁺ humanas, y se repitieron al menos tres veces (n=3).

La respiración mitocondrial se calculó de la siguiente forma:

- 1) La respiración no mitocondrial es la tasa después de la inyección de Rot / AA.

- 2) Respiración mitocondrial basal: es la resta de la respiración no mitocondrial (valor OCR tras la inyección de rotenona+antimicina A) menos el OCR basal.
- 3) Respiración mitocondrial máxima: es la resta de la respiración no mitocondrial a la tasa de OCR después de las inyecciones de CCCP.
- 4) La glucólisis se calculó restando el valor de ECAR basal al valor del ECAR después de la segunda inyección de glucosa 5mM (es decir, 10mM de glucosa).

4.3.7.3. Actividad enzimática

Las células HL60 y U937 se incubaron en presencia de WIN-55 (50 μ M ó 100 μ M) durante 6 horas, Olaparib 10 μ M (durante 7 horas) o ambos (una preincubación de 1 hora con Olaparib + 6 horas con WIN-55). Las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS. Una vez lavadas, se resuspendieron en el volumen de tampón de ensayo requerido en cada kit de ensayo enzimático y se mantuvieron en hielo durante 10-20 minutos, dependiendo del kit de ensayo enzimático en cuestión. Tras centrifugar a 4 °C y 12.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante resultante se utilizó para realizar el ensayo enzimático. Todas las enzimas de glucólisis se analizaron mediante diferentes kits de actividad enzimática (Biovision) según las instrucciones del fabricante. Por último, los resultados fueron normalizados por número de células.

4.3.8. Análisis Estadísticos

A menos que se indique lo contrario, los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente. Para los análisis estadísticos, se utilizó el software SPSS versión 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS, Chicago, IL, EE. UU) y el software GraphPad Prism 5, y la significación estadística se definió como $p \leq 0,05$. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Para evaluar el efecto de los fármacos sobre las distintas variables analizadas se empleó el test ANOVA ó el test t -student para datos pareados. La supervivencia de los ratones fue calculada desde el día del inicio del tratamiento hasta la muerte por cualquier causa, usando la estimación de Kaplan Meier. Para la comparación entre las curvas de infiltración de LMA de los ratones se empleó el test de modelo general de medidas repetidas. Las imágenes de esquema se crearon con BioRender.

4.3.9. Declaración de ética

Toda investigación que involucre material humano o muestras de animales fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Virgen del Rocío y fue llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Efecto antimieloma de WIN-55

5.1.1. WIN-55 disminuye selectivamente la viabilidad de las células de MM

En primer lugar, se evaluó el efecto del cannabinoide WIN-55 sobre la proliferación celular y la viabilidad de varias líneas celulares de MM mediante ensayos de MTT usando el kit Cell Counting Kit-8 (CCK-8) y ensayos de citometría de flujo.

La incubación de las líneas celulares MM1.R, MM1.S, RPMI y U266 con WIN-55 redujo significativamente la viabilidad celular de todas las líneas estudiadas a partir de la dosis de 10 μM en el caso de la línea MM1.R, MM1.S y RPMI y de 20 μM en el caso de la U266 a las 18 horas de incubación, en comparación con las células control tratadas con vehículo (Figura 26).

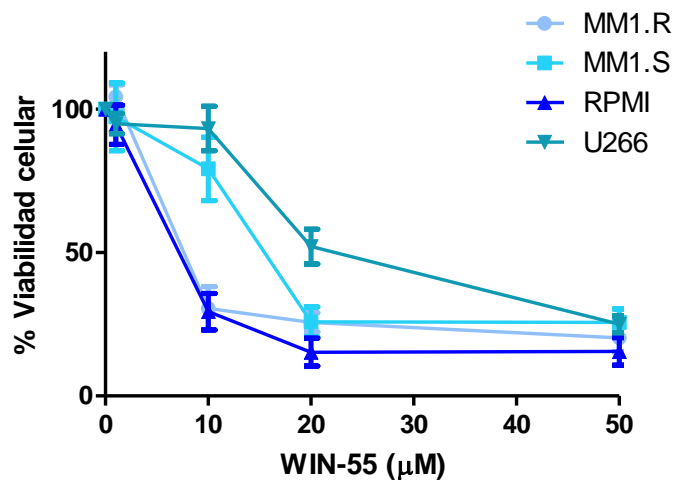


Figura 26. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo CCK-8 en las líneas celulares de mieloma múltiple MM1.R, MM1.S, RPMI y U266 después de la incubación con concentraciones crecientes del cannabinoide WIN-55 durante 18 horas. Los valores medios de proliferación de las muestras de control no tratadas se tomaron como 100%. Los experimentos se repitieron 4 veces en cada caso (n=4).

El patrón de sensibilidad varió de la línea U266, la más resistente, (IC50 = 21,15 μ M) a la línea RPMI que fue la más sensible (IC50 = 7,89 μ M). Para confirmar el efecto antiproliferativo de WIN-55, llevamos a cabo un tratamiento con WIN-55 en las líneas celulares U266 y RPMI y la muerte celular se determinó mediante citometría de flujo (Figura 27) tras 18 h de tratamiento, confirmando los resultados obtenidos previamente.

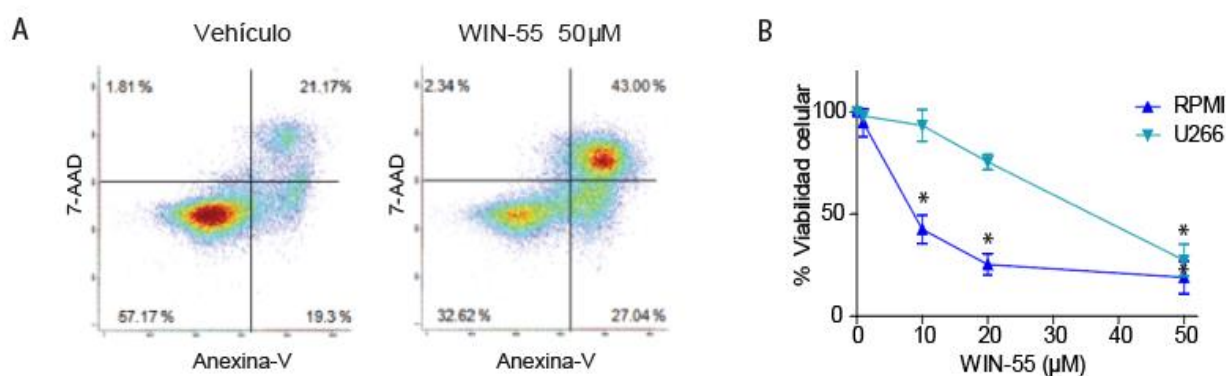
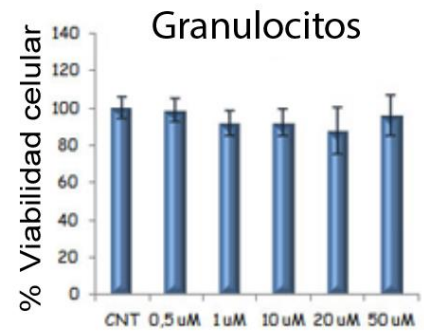
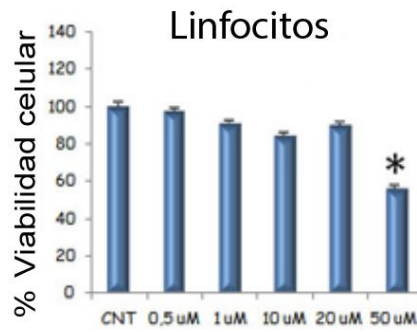
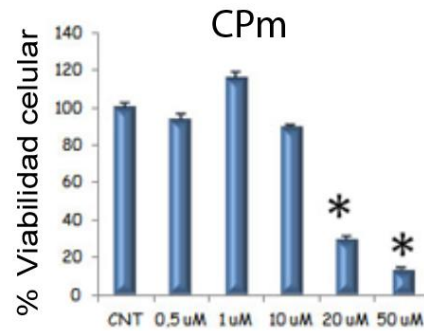
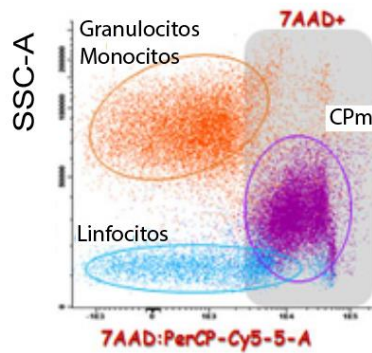


Figura 27. Viabilidad celular determinada por citometría de flujo usando Anexina V / 7-AAD en las líneas celulares U266 y RPMI tras la exposición a WIN-55 durante 18 h. A) Gráficos de puntos de una muestra representativa de la línea celular U266 control y tratada con WIN-55 (50 μ M). B) Cuantificación de los resultados obtenidos en el análisis por citometría de flujo tras la incubación con WIN-55 (0-50 μ M). Los datos se expresan como porcentaje del total de células vivas (fracción Anexina V⁻ / 7-AAD⁻).

El efecto de WIN-55 se examinó también *ex vivo* en células plasmáticas mielomatosas (CPm) de seis pacientes con MM. Para ello, se identificaron dichas células por citometría de flujo como se indica en la Figura 16 y, adicionalmente, se estudió su viabilidad con el marcaje de 7-AAD/Anexina-V. Después del tratamiento con WIN-55, las CPm mostraron una disminución significativa en la viabilidad celular en comparación con las células control (85% de células CPm muertas tras el tratamiento a la dosis de 50 μ M). Por el contrario, la viabilidad celular de otras poblaciones de células normales,

incluyendo los granulocitos-monocitos y linfocitos obtenidos de médula ósea de los pacientes y donantes sanos apenas se vio afectada (Figura 28A). Sólo la viabilidad de los linfocitos B se redujo moderadamente con la dosis más alta probada de WIN-55 (Figura 28B).

A



B

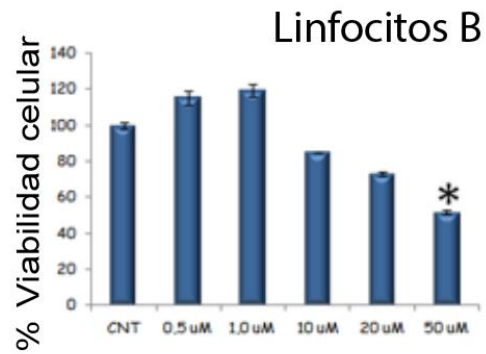
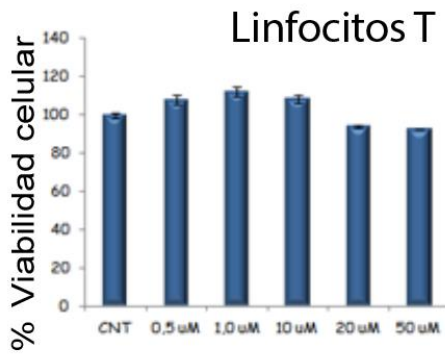


Figura 28. A) Gráfico de puntos representativo y diagramas de barras de las distintas poblaciones celulares de MO de pacientes de MM tras el tratamiento ex vivo con dosis crecientes de WIN-55. Las células plasmáticas se identifican como CD38⁺, los linfocitos como CD45⁺ y las células granulomonocíticas como CD64⁺ tras las dosis indicadas de WIN-55 durante 18 horas. Se representa la media de los resultados obtenidos tras el estudio de viabilidad por FACS de todos los pacientes con MM estudiados (n=6). Los datos corresponden al porcentaje de células 7-AAD⁺. B) Viabilidad de las poblaciones desglosadas de linfocitos T y B en las mismas condiciones que las representadas anteriormente. Los valores medios de proliferación de las muestras control no tratadas se tomaron como 100%. * indica diferencias significativas con un valor de p ≤0,05.

Además, analizamos el efecto antiproliferativo de WIN-55 sobre las células madre hematopoyéticas (CD34⁺) normales residuales de pacientes con MM y, sorprendentemente, la viabilidad celular de las células madre hematopoyéticas no se vieron afectadas por el tratamiento con WIN-55 (Figura 29).

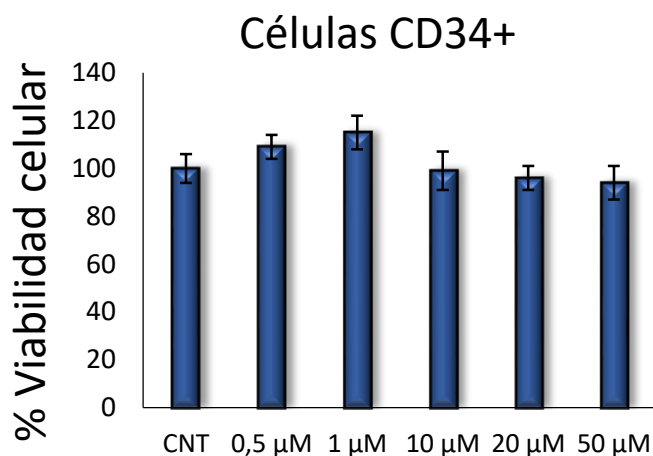


Figura 29. Análisis de la viabilidad celular en células madre hematopoyéticas (CD34⁺) previamente separadas por AutoMacs usando MicroBeads anti-CD34 después del tratamiento con WIN-55, mediante ensayo con CCK-8. Los valores medios de las muestras de control no tratadas se tomaron como 100%.

Estos resultados indican que los cannabinoides tienen un efecto antiproliferativo y pro-apoptótico muy selectivo sobre las células mielomatosas, mientras que la viabilidad de las células sanas, incluyendo las células precursoras hematopoyéticas no se afectan tras la exposición a WIN-55.

5.1.2. El efecto de WIN-55 está mediado por mecanismos apoptóticos.

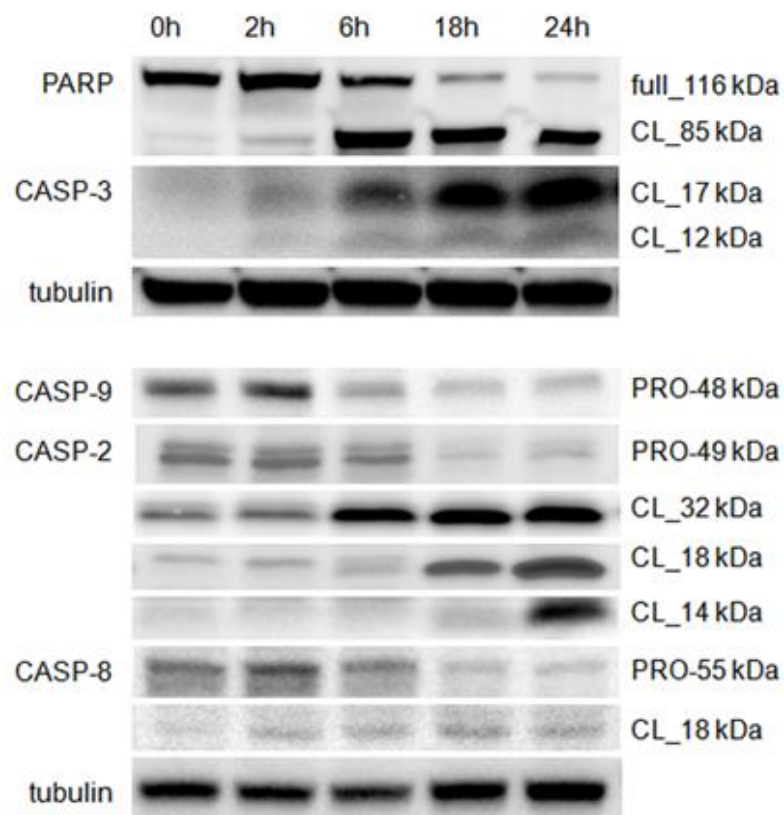
Para evaluar si el efecto antiproliferativo de WIN-55 está mediado por mecanismos apoptóticos, se analizó la expresión de las proteínas PARP, caspasas y otras proteínas pro / anti-apoptóticas (de la familia Bcl-2) en la línea celular de MM U266.

El tratamiento con WIN-55 indujo la escisión de la forma completa de PARP de manera dependiente del tiempo, con un aumento concomitante del fragmento proteolizado de 89 kDa, que se convirtió en ligeramente detectable tras sólo 2 horas de exposición. Además, se evaluó la activación de la caspasa-3 usando un anticuerpo que reconoce sus formas escindidas de 17 kDa y 12 kDa, respectivamente. La expresión de ambas formas escindidas aumentó con el tiempo, en paralelo a la fragmentación de PARP. Esto indica que el efecto anti-proliferativo de WIN-55 es consistente con una inducción de la activación de la cascada de caspasas (Figura 30A).

Con el fin de identificar las principales vías de apoptosis a través de las cuales WIN-55 ejerce su efecto pro-apoptótico, ya sea la vía intrínseca, la extrínseca o la asociada a estrés de retículo endoplasmático, se evaluó la expresión de las principales caspasas iniciadoras, Casp-9, Casp-8 y Casp-2, respectivamente. Como se muestra en la figura 30B, la expresión de las tres pro-caspasas disminuyó después de 2 h de exposición a los cannabinoides, pero sólo en el caso de la Casp-2 se detectó un fuerte aumento en la expresión de todas las formas escindidas. Por lo tanto, el procesamiento y la activación de Casp-2 fue mucho más notable que la observada para Casp-8 y -9.

Para llevar a cabo un análisis aún más detallado de los mecanismos implicados en la apoptosis inducida por WIN-55, se analizaron varias proteínas de la familia Bcl-2, como MCL-1, Bcl-XL, Bax y Bak involucradas en el proceso de apoptosis.

A



B

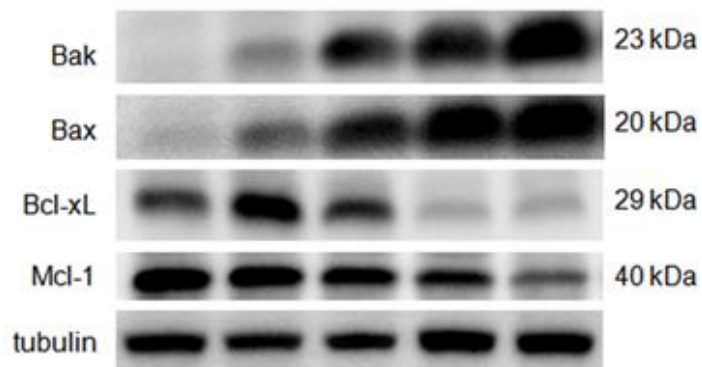


Figura 30. Análisis mediante Western blot de la expresión de proteínas implicadas en procesos apoptóticos en células U266 tratadas con WIN-55 (50 μ M) durante 0, 2, 6, 18 y 24 horas. (A) Perfil de la evolución temporal de la expresión de la caspasa 3 y su sustrato, PARP. (B) Expresión de las caspasas iniciadoras principales Casp-9, Casp-2 y Casp-8. La expresión de β -tubulina se utilizó como control de carga. (PRO ó full: Proteínas en su totalidad; CL: formas escindidas).

El estudio de expresión por Western blot (Figura 31) mostró un aumento notable de los reguladores pro-apoptóticos Bak y Bax, mientras que el nivel de expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y MCL-1, disminuyó con el tiempo.

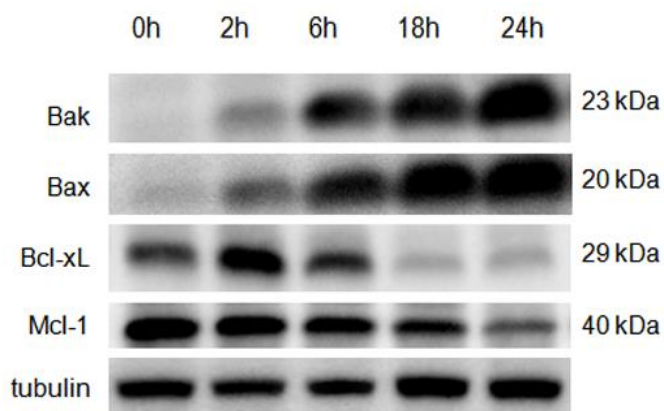


Figura 31. Western blot de las proteínas de la familia Bcl-2 Bak, Bax, Bcl-xL y Mcl-1 de células U266 tras el tratamiento con WIN-55 (50 μ M) durante el tiempo indicado. La expresión de β -tubulina se utilizó como control de carga.

Para determinar si el efecto pro-apoptótico de WIN-55 está mediado por la activación de las caspasas descritas anteriormente, las células se preincubaron con o sin el inhibidor de pan-caspasa Z-VAD con anterioridad al tratamiento con WIN-55. Como se muestra en la figura 32, Z-VAD inhibió la apoptosis inducida por cannabinoide en las líneas U266 y RPMI.

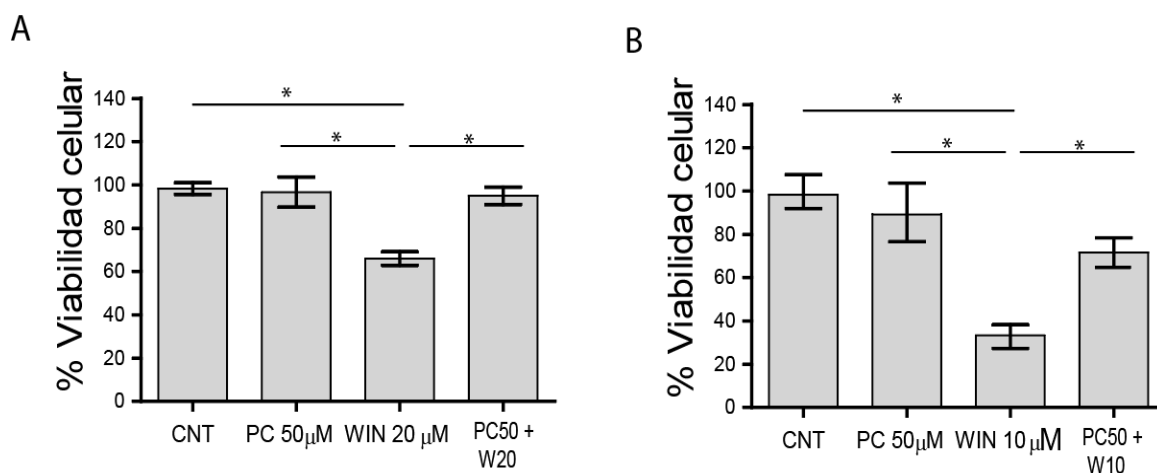


Figura 32. Viabilidad celular de las líneas celulares (A) U266 y (B) RPMI después de la incubación con un inhibidor de pan-caspasa (PC) y / o WIN-55 (W) a las dosis indicadas en cada caso durante 18 h mediante ensayos con CCK-8. Los valores medios de las muestras de control no tratadas se tomaron como 100%. * indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$.

Todos estos resultados muestran que el efecto del cannabinoide WIN-55 en las células de MM está, al menos en parte, mediado por mecanismos apoptóticos, siendo posiblemente la vía de la Casp-2 la activada más fuertemente.

5.1.3. Vías de señalización alteradas por la exposición de las células mielomatosas a WIN-55

Con el fin de explorar las vías de señalización implicadas en la inducción de la apoptosis por WIN-55, se evaluó el perfil de expresión y fosforilación de las quinasas p-JNK, p-Erk1/2, p-38, MAPK, p-Akt mediante western blot (Figura 33).

El tratamiento de la línea celular U266 con el cannabinoide WIN-55 incrementó ligeramente la fosforilación de p-JNK y p-Erk1/2, mientras que la activación de la vía p-p38-MAPK disminuyó moderadamente. Curiosamente, WIN-55 también indujo una regulación al alza de p-Akt en momentos tempranos, mientras que, en tiempos más tardíos, los niveles de expresión mostraron una fuerte caída.

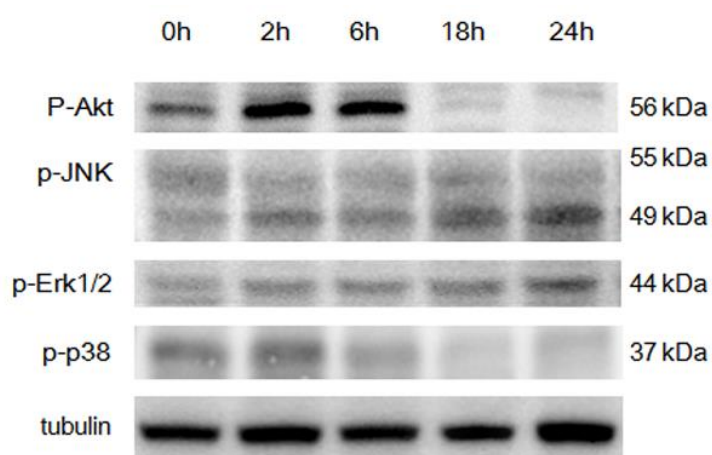


Figura 33. Análisis de la expresión mediante Western blot de las proteínas fosforiladas p-Akt, p-Erk1/2, p-JNK y p-p38 en extractos de células U266 incubadas con 50 μ M de WIN-55 en los tiempos indicados. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

De acuerdo con estos resultados, WIN-55 modula diferentes vías implicadas en el equilibrio de la supervivencia / muerte celular. Además, la vía de Akt está fuertemente modulada y muestra una respuesta bifásica, con una activación a corto plazo y una regulación a la baja a largo plazo.

5.1.4. La síntesis de novo de ceramidas está involucrada en la apoptosis inducida por WIN-55

Se ha descrito que la acumulación de ceramidas sintetizadas *de novo* está implicada en el efecto pro-apoptótico de los cannabinoides en células de glioma (Velasco et al., 2005, 2012). Por ello, se evaluó la expresión de ceramidas mediante inmunofluorescencia en células de MM tras la exposición a WIN-55 (Figura 34).

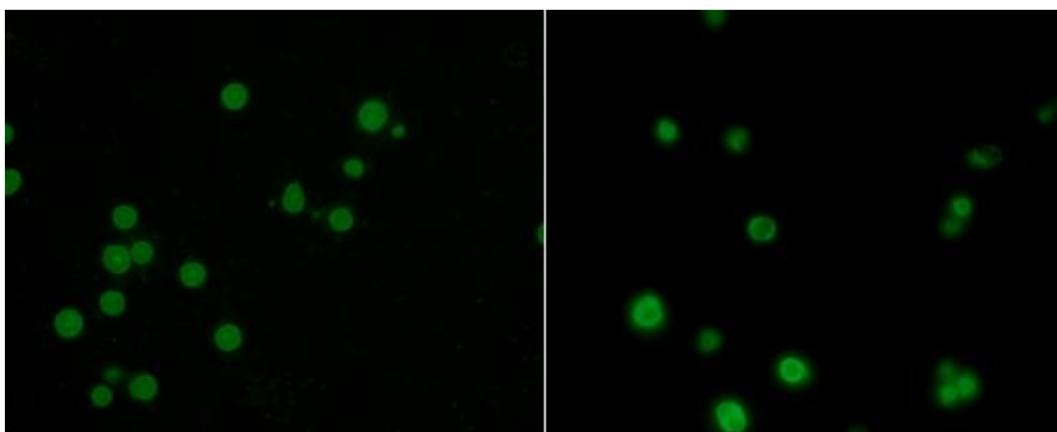


Figura 34. Microfotografía de tinción de ceramidas en células U266 sin tratar (izquierda) y tratadas con 50 µM de WIN-55 (derecha) durante 6 horas.

Los resultados de este experimento mostraron un aumento notable en la expresión de ceramida total mediante inmunocitoquímica en las células U266 tratadas con WIN-55 en comparación con las células no tratadas.

Además, el nivel de expresión de serina palmitoiltransferasa (SPT), la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de novo de la ceramida, se incrementó en células U266 después de la incubación con WIN-55 (Figura 35).

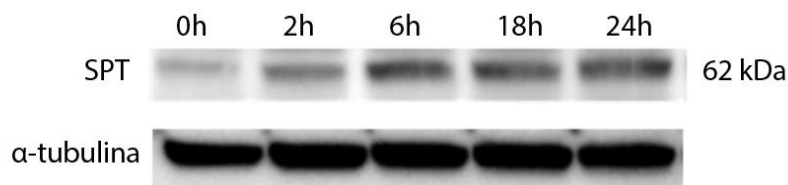


Figura 35. Western blot en células U266 tratadas con 50 μ M de WIN-55 durante los tiempos indicados para la detección de SPT. La expresión de α -tubulina se utilizó como control de carga.

Se observó un aumento moderado de la SPT a las 2h después del tratamiento con WIN-55, que alcanzó el nivel máximo a las 18h, coincidiendo con el punto de la inhibición de p-Akt en el tiempo.

Para confirmar la implicación de este fosfolípido en la apoptosis inducida por cannabinoides, las células de MM se preincubaron con un inhibidor de la síntesis de ceramida, la fumonisina B1.

Como se muestra en la figura 36A, el bloqueo farmacológico de la síntesis de ceramidas mediado por fumonisina B1, inhibe la fragmentación de PARP inducida por WIN-55 en células U266. Además, la fumonisina B1 revertió el efecto antiproliferativo inducido por el cannabinoide en U266 y RPMI, tal como se constató mediante CCK-8 (Figura 36B).

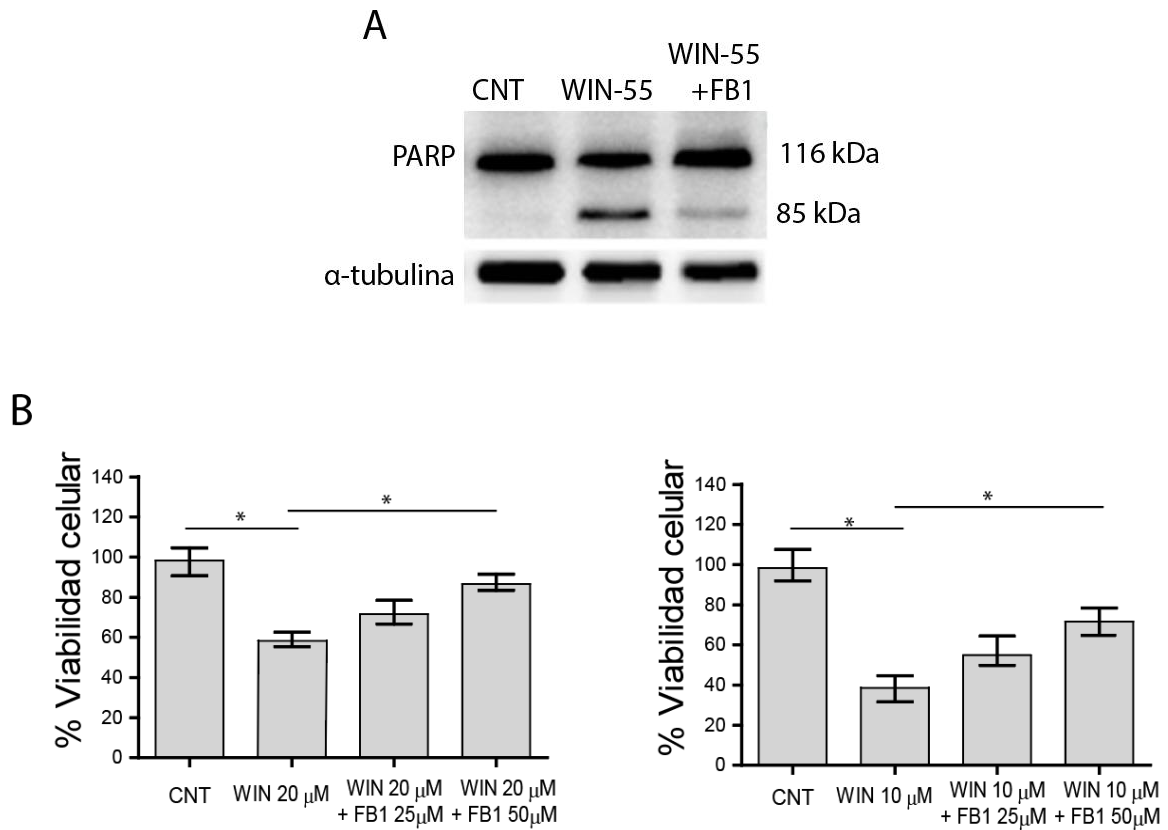


Figura 36. A) Niveles de expresión de PARP evaluados por Western blot en células tratadas con vehículo, 50 μ M de WIN-55 ó 50 μ M de Fumonisina B1 (FB1) junto con el cannabinoide. Se utilizó α -tubulina como control de carga. (B) Análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo CCK-8 en células U266 (izquierda) y RPMI (derecha) tratadas con WIN-55, FB1 o la combinación de ambos durante 18 h a las dosis indicadas. * indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$. (CNT, control; FB1, fumonisina B1).

Estos datos confirmaron que la ceramida juega un papel clave en la apoptosis inducida por el cannabinoide WIN-55 en células de MM.

5.1.5. Efecto de WIN-55 en el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias

Por otro lado, las células mielomatosas tienen un RE muy hipertrofiado, y presentan una intensa respuesta frente al estrés del retículo que les permite mantener su viabilidad. Por ello, se evaluó el efecto de WIN-55 en el estrés del RE en las células

U226. Para esto, estudiamos la expresión de distintas proteínas implicadas en la respuesta al estrés del RE por Western blot en la línea U266 (Figura 37).

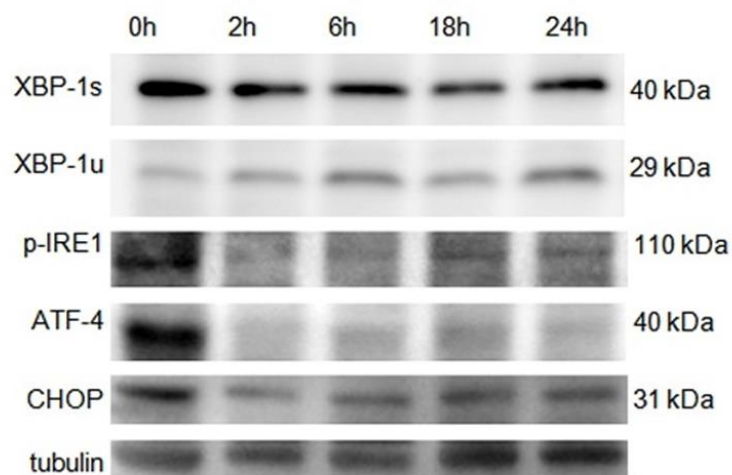


Figura 37. Estudio de la expresión de las proteínas involucradas en la respuesta al estrés del RE, como CHOP, ATF-4, p-IRE1 y XBP-1 en sus formas XBP-1s (escindida) y XBP-1u (no escindida) después del tratamiento con 50 μ M de WIN-55 a los tiempos de tratamiento especificados. Se utilizó β -tubulina como control de carga.

Contrariamente a nuestras expectativas, encontramos una disminución leve pero sostenida de la expresión de proteínas de estrés del RE como CHOP, ATF-4, p-IRE1 y XBP-1 s, en comparación con las células control, y un ligero aumento del nivel de XBP-1u, lo que podría sugerir que los cannabinoides disminuyen o evitan la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en células de MM.

Es importante destacar que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es un punto de no retorno durante el proceso de apoptosis. Por lo tanto, evaluamos los cambios del $\Delta\psi_m$ en células U266 tratadas con WIN-55 y se observó un notable descenso del $\Delta\psi_m$ en células U266 tras 30 minutos de incubación, que siguió decreciendo ligeramente con el tiempo (Figura 38).

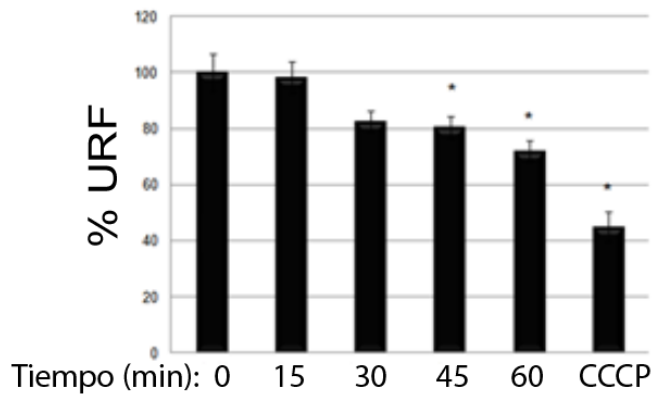


Figura 38. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en células U266 después del tratamiento con 50 μ M de WIN-55, en los momentos indicados o CCCP como control positivo de la técnica. Las células se marcaron con TMRE y la señal se analizó con un lector de fluorescencia en placa usando el filtro con Em/Exc=485/538 nm. * indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$. (URF: unidades relativas de fluorescencia).

5.1.6. El efecto de WIN-55 en las células de MM está mediado por el receptor CB2

Para saber si el efecto proapoptótico de WIN-55 depende de los niveles de los receptores cannabionoides presentes en la célula, se evaluó la expresión de los receptores cannabinoideos CB1 y CB2 en líneas celulares de MM, así como en las células normales hematopoyéticas (Figura 39).

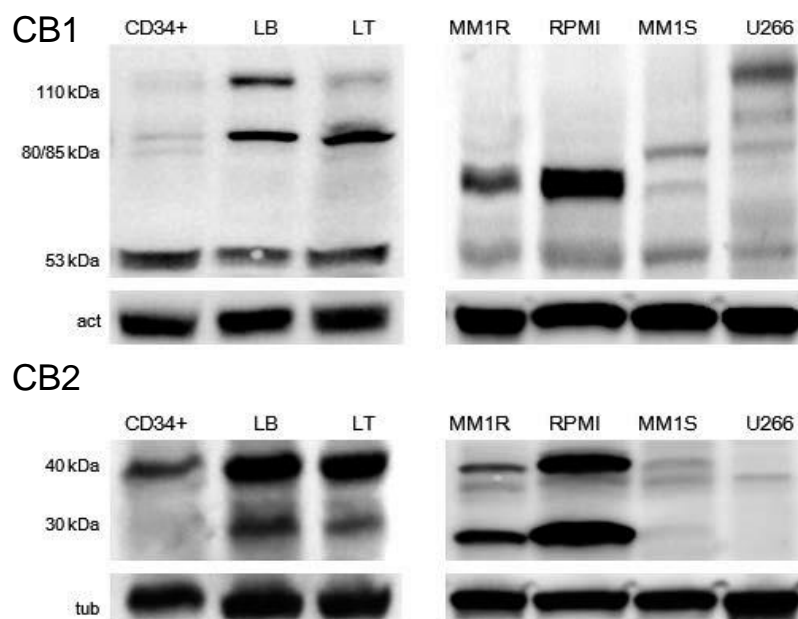


Figura 39. Patrón de expresión del receptor CB1 y CB2 en varias líneas celulares de MM y células primarias sanas (células madre hematopoyéticas, células T y B) previamente purificadas por AutoMacs determinadas por Western blot. En el caso de CB1, la banda de 53 kDa sería la más aceptada para este receptor y para CB2, sería la banda de 40 kDa. Se utilizó β -actina y α -tubulina como control de carga. (CD34+: células madre hematopoyéticas; LB: linfocitos B; LT; linfocitos T).

Se observó que ambos receptores mostraron múltiples bandas y un patrón muy heterogéneo entre los diferentes subtipos de células analizadas. En cuanto a CB1, la banda principal fue la de 53 kDa, lo que es congruente con el tamaño esperado de la secuencia de aminoácidos de su forma monomérica, que es la forma inactiva. El patrón de CB1 también exhibió otras bandas inmunorreactivas, aproximadamente a 80/85kDa, 100 kDa y ~70 kDa. CB2 exhibió principalmente una banda a 40 kDa, en consonancia con el peso del monómero CB2, y otra banda de 30 kDa que podría corresponder a una forma truncada. Esta última fue fuertemente expresada en las líneas celulares más sensibles a WIN-55 (MM1.R y RPMI).

Estos datos sugieren que la expresión de receptores cannabinoides es bastante heterogénea en las células CD34⁺, linfocitos y líneas celulares de MM, aunque con una tendencia hacia una mayor expresión de CB2 en líneas celulares más sensibles al efecto proapoptótico de los cannabinoides.

5.1.7. WIN-55 potencia sinérgicamente el efecto de otros agentes antimieloma

Algunos de los fármacos empleados en el tratamiento del mieloma múltiple incluyen la dexametasona, un corticoesteroide, y el melfalán, un fármaco alquilante y citotóxico. Quisimos estudiar si el cannabinoide WIN-55 presentaba un efecto sinérgico

con los mismos. Para ello, usamos las líneas celulares U266, RPMI, U266-LR7 y RPMI-LR5 (estas dos últimas resistentes al melfalán).

Para ello, realizamos estudios de viabilidad de las diferentes combinaciones tras realizar una curva dosis-respuesta de cada fármaco por separado. La dosis de WIN-55 utilizada fue de 20 μ M en todas las líneas, mientras que las de dexametasona (Figura 40) y melfalán (Figura 41) variaron dependiendo de cada línea celular.

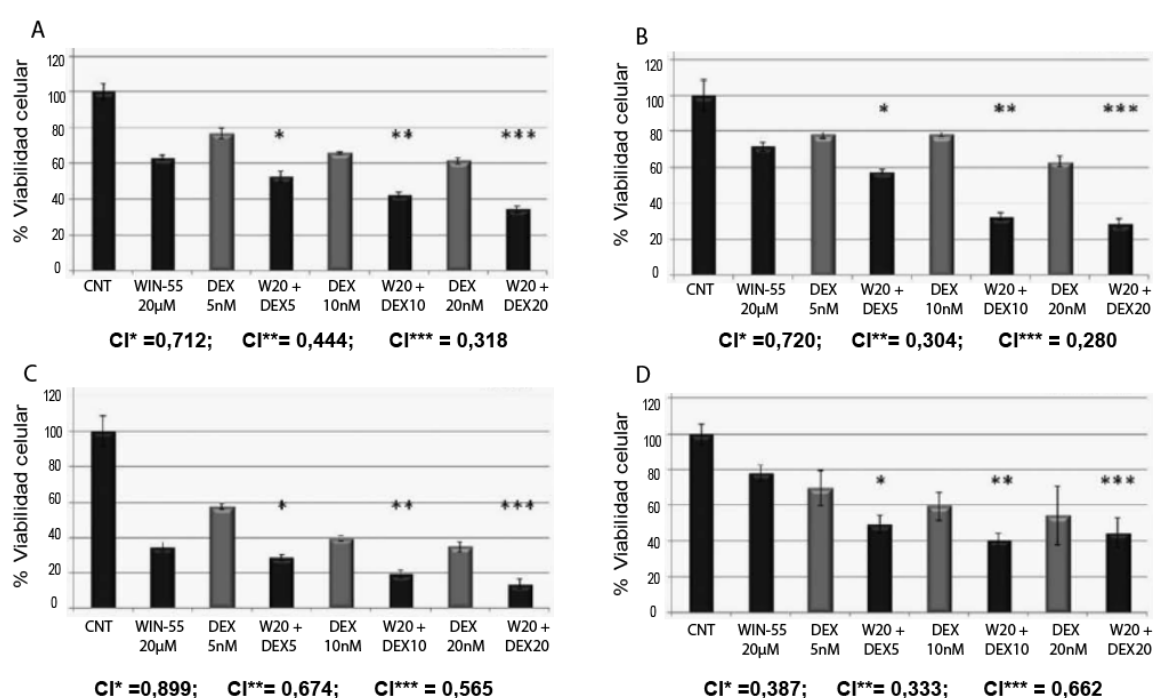


Figura 40. Estudio de la viabilidad mediante el ensayo de CCK-8 en las líneas celulares A) U266, B) U266-LR7, C) RPMI y D) RPMI-LR5 tras el tratamiento combinado de WIN-55 (20 μ M) y concentraciones crecientes de dexametasona. Los asteriscos indican los valores del índice de combinación (CI) que se muestra debajo de cada gráfico.

El índice (CI) obtenido tras la combinación de las diferentes dosis de los fármacos indicó que WIN-55 presentaba un carácter sinérgico con dexametasona (Figura 40) y melfalán, incluso en las líneas celulares resistentes al melfalán (Figura 41). Estos

resultados indican que WIN-55 en combinación con dexametasona o melfalán no solo actúa sinérgicamente, sino que también sensibiliza de nuevo a las células resistentes a melfalán.

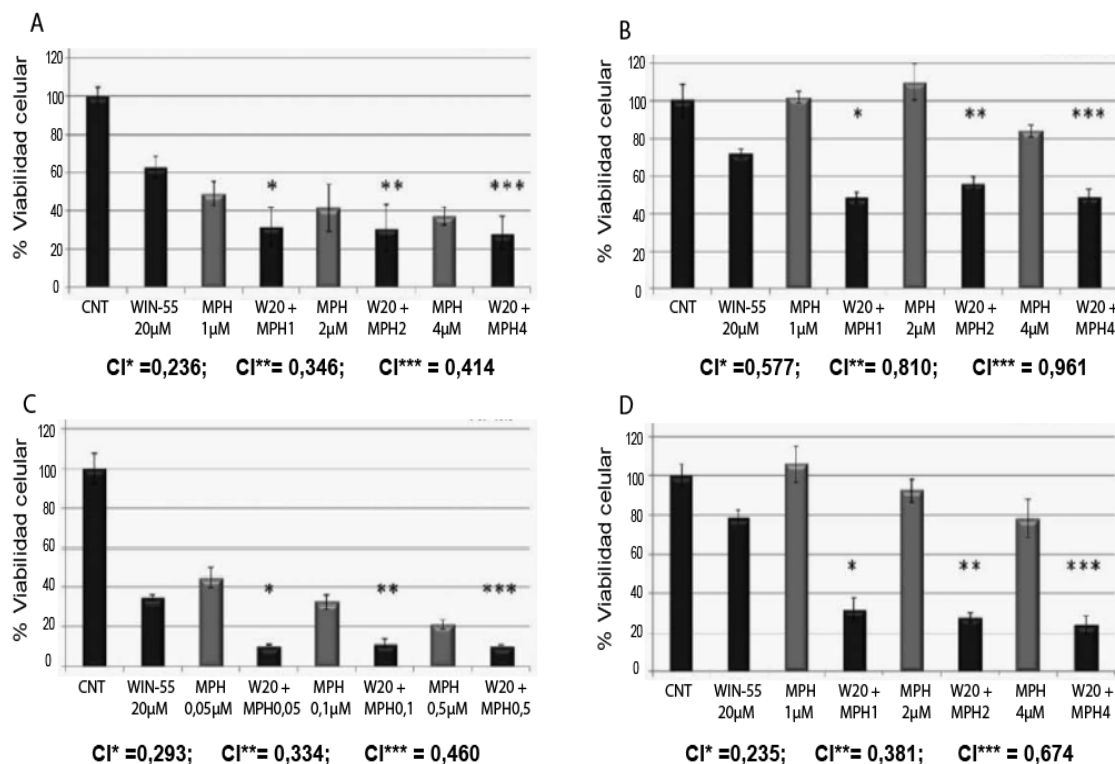


Figura 41. Estudio de la viabilidad mediante el ensayo de CCK-8 en las líneas celulares A) U266, B) U266-LR7, C) RPMI y D) RPMI-LR5 después del tratamiento con una dosis fija de WIN-55 (20µM) en combinación con concentraciones crecientes de melfalán. Los asteriscos indican los valores del índice de combinación (CI) que se muestra debajo de cada gráfico.

5.1.8. La administración de WIN-55 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

Por último, se analizó el efecto antitumoral de los cannabinoides *in vivo* utilizando un modelo de xenoinjerto de MM humano en ratones NOD/SCID inmunodeficientes (NSG) (Figura 42).

Se observó una pérdida notable y progresiva de volumen tumoral después de la administración de WIN-55 en comparación a los animales control tratados con vehículo.

Estos resultados, no sólo confirman el efecto antiproliferativo de los cannabinoides, sino que muestran que la administración de cannabinoides frena o incluso evita el crecimiento del plasmocitoma derivado de la línea celular U266 en los ratones NSG.

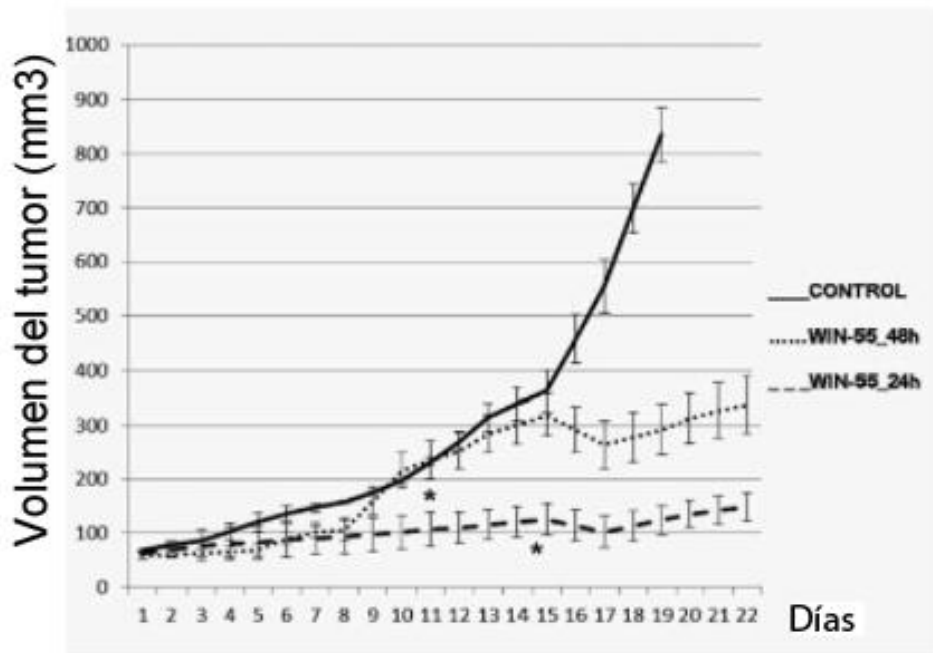


Figura 42. Efecto antimieloma *in vivo* del cannabinoide WIN-55 en plasmocitomas inducidos en ratones NSG por inoculación de células U266. Los ratones (10 ratones por grupo) fueron asignados al azar en tres grupos para recibir intraperitonealmente 5 mg/kg de WIN-55 cada 24 h, cada 48 h, y vehículo (<0,15% DMSO en medio) como grupo control. El gráfico muestra la evolución del volumen tumoral durante los días indicados. Los datos representan la media del volumen de todos los ratones de cada grupo.

5.2. Efecto antileucémico de WIN-55

5.2.1. Las líneas celulares de LMA humanas HL60, KG1a, U937 y MV-4-11 son sensibles a los efectos citotóxicos de WIN-55, mientras que las células primarias sanas no se ven afectadas.

Para estudiar si WIN-55 mostraba algún efecto sobre la viabilidad y proliferación de las líneas celulares leucémicas humanas U937, HL60, KG-1a y MV-4-11 y las células primarias sanas aisladas (linfocitos T y B) *in vitro*, se expusieron a diversas concentraciones de WIN-55 (100 nM-50 μ M) durante 18 horas y la viabilidad celular se midió mediante Cell Counting Kit-8 (Figura 43).

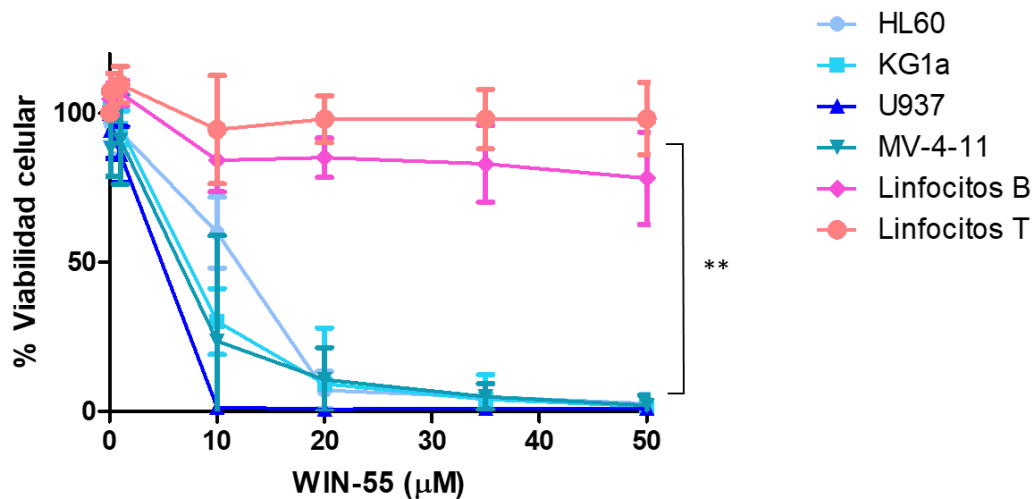


Figura 43. Estudio de la viabilidad y proliferación de las líneas celulares de LMA y células primarias sanas.

Las líneas celulares de LMA HL60, KG-1a, U937 y MV-4-11 y las poblaciones de células, linfocitos T y linfocitos B de donantes sanos, previamente aisladas por AutoMACS, se trataron con concentraciones crecientes del cannabinoide WIN-55 durante 18 horas y la viabilidad celular se analizó mediante Cell Counting Kit-8.

Como se muestra en la Figura 43, la dosis letal media (LD_{50}) en todas las líneas estudiadas fue menor a 10 μ M, dosis de WIN-55 que condujo a una reducción muy significativa en la viabilidad y/o proliferación de las líneas celulares de LMA de una manera dependiente de la concentración. Por el contrario, la viabilidad y/o proliferación

de las subpoblaciones de células normales de donantes sanos no se vio afectada incluso a las dosis más altas testadas. Las líneas celulares más sensibles bajo nuestras condiciones de estudio fueron HL60 y U937, que presentaron una LD₅₀ de 6,99 y 6,35 μM respectivamente tras 18 horas de incubación.

Además, analizamos el efecto de WIN-55 sobre estas dos líneas celulares a diferentes tiempos de incubación y dosis más bajas (Figura 44).

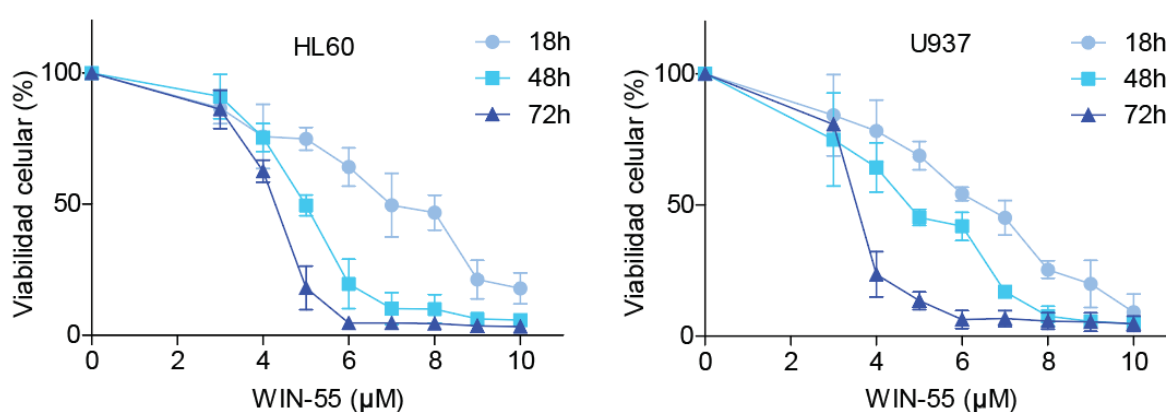
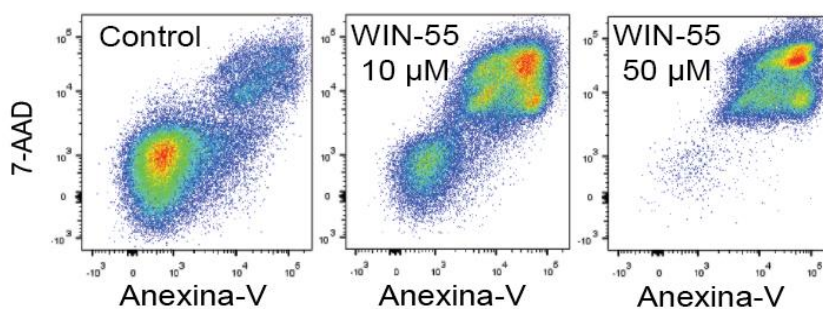


Figura 44. Estudio de viabilidad celular de las líneas HL60 y U937 mediante Cell Counting Kit-8 a diferentes tiempos (18, 48 y 72 horas) de incubación a dosis de 0-10 μM de WIN-55.

Estos experimentos nos permiten concluir que el efecto antiproliferativo de WIN-55 es dependiente de concentración y de tiempo de exposición al fármaco.

Para comprobar el tipo de muerte celular producida tras la exposición a WIN-55, se realizaron estudios de viabilidad mediante citometría de flujo usando un marcaje con Anexina V y 7AAD. La figura 45 muestra cómo la frecuencia de células Anexina V⁺/7AAD⁺ incrementa de manera dosis dependiente, al igual que se observó en células Anexina V⁺/7AAD⁻ a dosis más bajas (datos no mostrados), lo que indica que la muerte celular se produce a través de apoptosis.

A



B

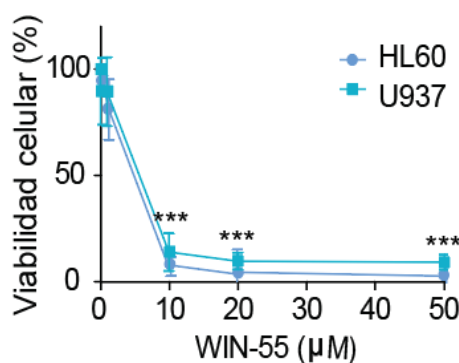


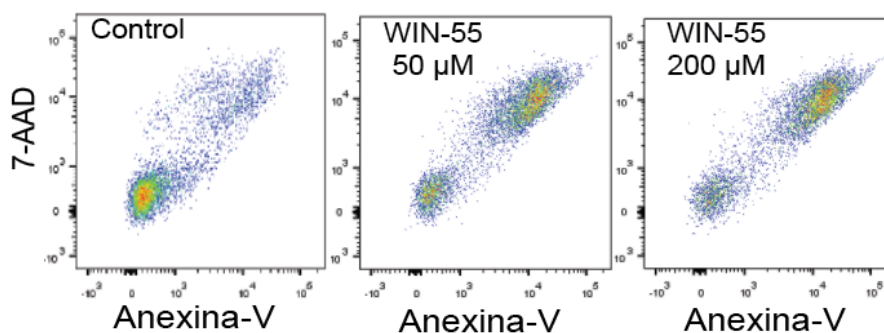
Figura 45. A) Los gráficos de citometría corresponden a un ejemplo representativo del análisis de viabilidad de la línea HL60 por citometría de flujo a las 18 horas. Las condiciones control, 10 µM y 50 µM de WIN-55 se muestran en esta figura. B) Análisis de las células vivas (7AAD⁻/Anexina V⁻) tras el tratamiento con diferentes dosis de WIN-55 en las líneas HL60 y U937 a 18 horas. En todos los casos, los valores medios de viabilidad de las muestras control se tomaron como 100%. Los resultados son representativos de cuatro experimentos. *** indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,0005$.

Por otro lado, quisimos estudiar si el efecto citotóxico de WIN-55 se producía de manera aguda tras su administración en las células o si era consecuencia de un periodo de tiempo prolongado en el medio de cultivo. Para ello, incubamos las células HL60 con altas dosis de WIN-55 (50-200 µM) durante solo 15 minutos, seguido de un lavado de las células y posterior incubación de las mismas en medio completo sin fármaco.

La viabilidad celular se analizó 18 horas después mediante tinción con Anexina V/7AAD mediante citometría de flujo (Figura 46), y observamos que la viabilidad celular

se vio significativamente afectada tras 15 minutos de incubación con WIN-55 a las dosis testadas.

A



B

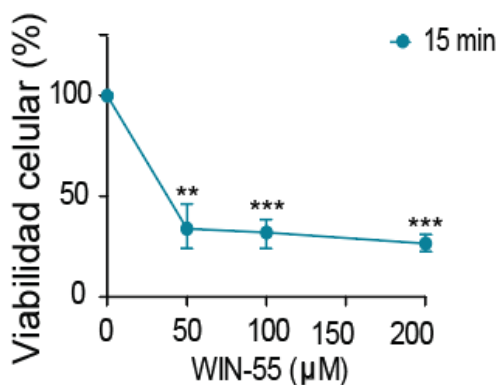


Figura 46. A) Los gráficos de citometría corresponden a un ejemplo representativo del análisis de viabilidad por citometría de flujo en la línea HL60 expuesta a distintas dosis de WIN-55 durante 15 minutos y analizada a las 18 horas. Las condiciones control, 50 μM y 200 μM de WIN-55 se muestran en esta figura. B) Análisis de las células vivas (7AAD⁻/Anexina V⁻) tras el tratamiento con diferentes dosis de WIN-55 en la línea celular HL60 durante 15 min y analizadas a las 18 horas. En todos los casos, los valores medios de viabilidad de las muestras control se tomaron como 100%. Los resultados son representativos de cuatro experimentos. ** indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,005$ y *** $p \leq 0,0005$.

5.2.2. WIN-55 ejerce un efecto heterogéneo en las células leucémicas primarias de pacientes con LMA, mediado principalmente a través del receptor CB2.

Para determinar si el efecto antiproliferativo de WIN-55 se producía también sobre células leucémicas de pacientes, el efecto de WIN-55 *ex vivo* se examinó

mediante citometría de flujo sobre blastos obtenidos de 40 pacientes con LMA en el momento del diagnóstico.

Se obtuvieron las células mononucleares de muestras de MO después de centrifugación en gradiente con Ficoll y se incubaron con WIN-55 durante 18 horas. Después del tratamiento, las células de LMA se identificaron con una combinación de anticuerpos monoclonales contra los antígenos asociados a las células de LMA en el momento del diagnóstico previamente descrita (Ver sección Materiales y Métodos 5.3.1.3.2).

El análisis de viabilidad celular mediante tinción con Anexina V / 7AAD mostró una disminución notable (> 50%) en el 77,5% de los pacientes a una dosis de 50 μM de WIN-55 (Figura 47).

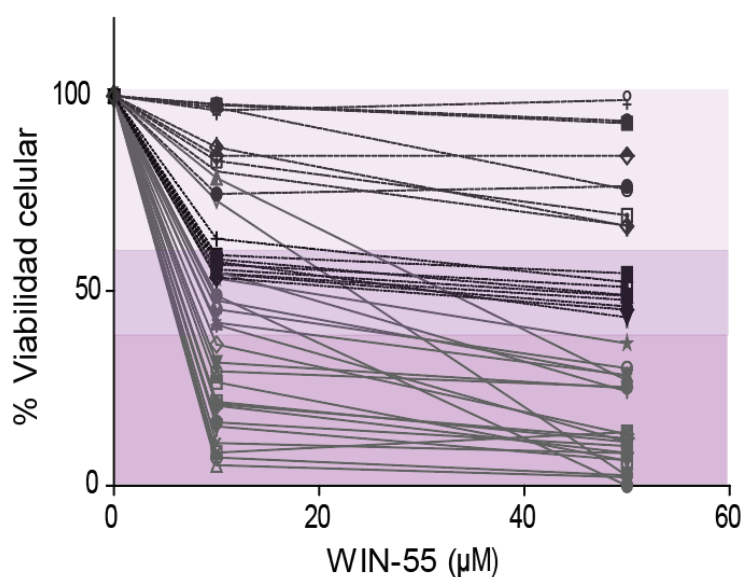


Figura 47. Efecto de WIN-55 ex vivo. Se incubaron células mononucleadas de 40 pacientes de LMA con 10 μM y 50 μM de WIN-55 y se analizó la viabilidad celular mediante marcaje con 7AAD / Anexina V por FACS a las 18 horas. Cada línea de la gráfica se corresponde con un paciente. Los resultados muestran un patrón muy heterogéneo de respuesta, por lo que dividimos a los pacientes en tres grupos según su sensibilidad al efecto antileucémico de WIN-55.

5.2.3. Relación entre la sensibilidad a WIN-55 y la expresión de receptores cannabinoides.

Ante estos resultados, quisimos comprobar si el efecto heterogéneo producido por los cannabinoides se correspondía con los niveles de receptores cannabinoides expresados por cada paciente, por lo que analizamos los niveles de transcripción de los receptores CB1 y CB2 en muestras de los pacientes mediante PCR cuantitativa (Figura 48).

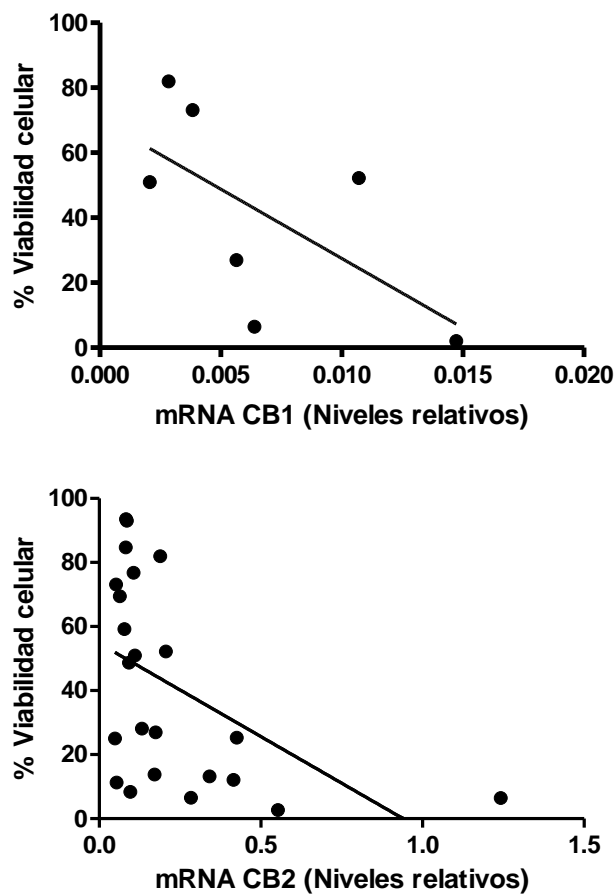


Figura 48. Correlación entre el efecto antileucémico de WIN-55 detectado por citometría de flujo tras el tratamiento durante 18 horas a una dosis de 50 μ M y los niveles de expresión de CB1 ($R=-0,3714$ y $P=0,13$) y CB2 ($R=-0.5079$ y $P=0,0134$) determinados por PCR cuantitativa. Estos niveles se relativizaron a los niveles obtenidos para la expresión del gen ABL (usado como housekeeping). Solo se usó las muestras de los pacientes con una infiltración en MO > 75% de blastos.

Observamos cómo existe una correlación inversa entre la expresión de ambos receptores y la viabilidad celular tras el tratamiento con WIN-55 durante 18 horas, de manera que los pacientes con mayores niveles de expresión de receptor presentan una mayor sensibilidad al fármaco y, por tanto, una menor viabilidad.

Los datos estadísticos muestran que sólo en el caso del receptor CB2 se produce una relación inversa significativa ($p=0,0134$), aunque los datos de CB1 también presentan una tendencia. Esto se puede deber a un menor número de pacientes incluidos en el caso de CB1, ya que, aunque se ha estudiado en el mismo número de pacientes, el nivel de expresión de CB1 en células del sistema inmune es indetectable en muchos casos.

A continuación, examinamos la citotoxicidad inducida por WIN-55 en líneas celulares de LMA en presencia de antagonistas selectivos de CB1 o de CB2. Con ese fin, las células de la línea HL60 se expusieron a 10 μM de WIN-55 en presencia o ausencia del antagonista CB1 (LY320135) y / o CB2 (SR144528), y se determinó la viabilidad celular 18 h después (Figura 49).

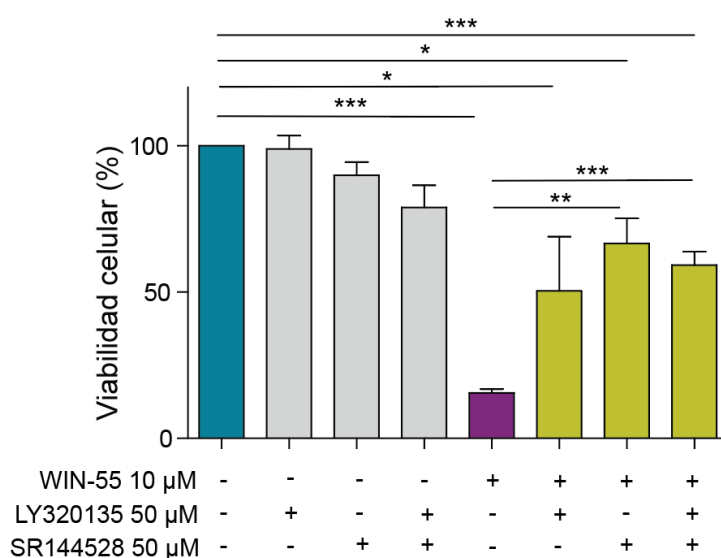


Figura 49. Estudio de la viabilidad celular por CCK-8 en la línea celular HL60 tras 18 horas de incubación con los antagonistas cannabinoides CB1 (LY320135) y / o CB2 (SR144528) solos o en combinación con WIN-55 (10 μ M).

Los resultados muestran que el tratamiento con el antagonista selectivo de CB2 SR144525, inhibe significativamente la muerte celular inducida por el cannabinoide WIN-55, mientras que LY320135, selectivo de CB1, no mostró datos estadísticamente significativos, aunque muestra una tendencia similar. Cuando se combinaron ambos antagonistas el resultado fue similar al obtenido por el antagonista selectivo de CB2 por si solo, por lo que no se observó ningún efecto sinérgico entre ambos antagonistas.

5.2.4. Análisis genético de las mutaciones presentes en blastos de pacientes, y su relación con la sensibilidad a WIN-55

También quisimos estudiar la relación entre la respuesta al tratamiento con WIN-55 en muestras primarias humanas con las mutaciones encontradas en los blastos de cada paciente. Para ello, los pacientes se categorizaron en tres grupos en relación a la función celular que desempeñan cada uno de los genes mutados (Figura 50): en verde, se muestran los pacientes que presentan mutaciones en los factores de transcripción (RUNX1 y CEPB α), en morado los genes implicados en proliferación y supervivencia (PTPN11, KIT, FLT3 Y KRAS), y en azul, los genes implicados en las modificaciones epigenéticas (NPM1, TET2, IDH1/2 y DNMT3 α). La figura 50 representa la sensibilidad de los blastos de los distintos pacientes de LMA estudiados en relación a la función molecular que desempeñan los genes que se encuentran mutados en cada caso.

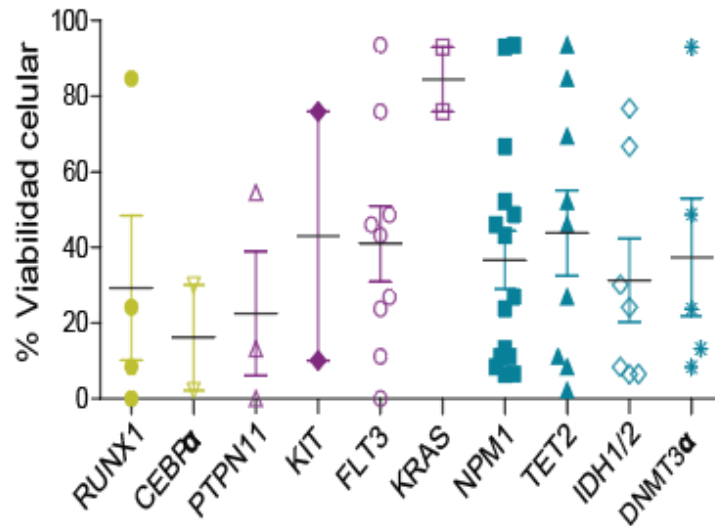


Figura 50. Representación de la correlación entre la sensibilidad de los blastos al tratamiento con WIN-55 tras incubar a una dosis de 50 μ M durante 18 horas y las mutaciones que presentan dichos blastos de pacientes en el momento del diagnóstico. Cabe destacar que la mayoría de los pacientes presentan más de un gen mutado. (Los datos de cada paciente se encuentran detallados en la Tabla 3).

Los resultados obtenidos en pacientes con LMA nuevamente muestran un patrón muy heterogéneo, donde no se observa una clara correlación entre la sensibilidad al fármaco WIN-55 y las mutaciones encontradas en cada paciente. Aunque en el caso de los pacientes con la mutación CEBP α se aprecia una mayor sensibilidad a WIN-55 y los pacientes con mutación en KRAS una mayor resistencia, sería pertinente aumentar el número de pacientes con dichas mutaciones en este estudio para corroborar dichos datos.

5.2.5. El cannabinoide WIN-55 tiene un potencial antileucémico potente y selectivo *in vivo*

Para explorar el efecto de los cannabinoides sobre el crecimiento de células de LMA humanas *in vivo*, las células HL60 se inyectaron por vía intravenosa en ratones inmunodeprimidos NSG irradiados. Este experimento genera un modelo de leucemia aguda humana bastante agresivo (el tiempo máximo de supervivencia sin tratamiento

nunca superó los 20 días), que se caracteriza por una infiltración medular en las fases iniciales que se extiende posteriormente por el individuo completo. Fenotípicamente, estos ratones presentan esplenomegalia, pérdida de peso, piloerección, caquexia y parálisis de las patas traseras en la etapa final de la enfermedad.

Para monitorizar la progresión de la enfermedad, una vez que se confirmó por citometría de flujo la infiltración de células humanas en MO, los ratones se asignaron a 4 grupos: ratones inyectados con células HL60 tratados con vehículo (HL60+vehículo), ratones con células HL60 tratados con 5 mg/kg/día de WIN-55 (HL60+WIN-55), ratones irradiados inyectados con medio RPMI y con el vehículo (Control+Vehículo), en lugar de células HL60, que no debían manifestar ningún síntoma excepto los provocados por el proceso de irradiación, y otro grupo control sin células tratado con WIN-55 (Control+WIN-55).

Tras 5 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron y el porcentaje de células humanas HL60 en MO, sangre periférica y bazo se cuantificó por citometría de flujo.

Como podemos apreciar en la Figura 51, WIN-55 redujo el número de células HL60 humanas en SP, MO y bazo tras 5 días de tratamiento en comparación con el grupo de ratones tratados con vehículo.

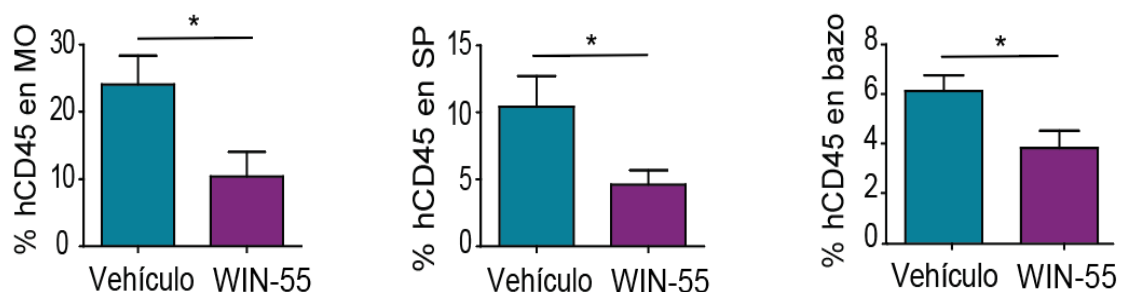


Figura 51. Estudio de la presencia de células CD45+ humanas en MO, SP y bazo de los ratones xenotrasplantados con células HL60 después de 5 días de tratamiento tras la confirmación de la enfermedad con vehículo o cannabinoide WIN-55 a una dosis de 5 mg/kg/día analizados por

citometría de flujo. Se usaron n=7 ratones en cada condición. * indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$

También se determinó el tamaño del bazo de los diferentes grupos de ratones después de 5 días de tratamiento para monitorizar la esplenomegalia típica de este modelo, que correlaciona directamente con la carga tumoral del ratón (Figura 52).

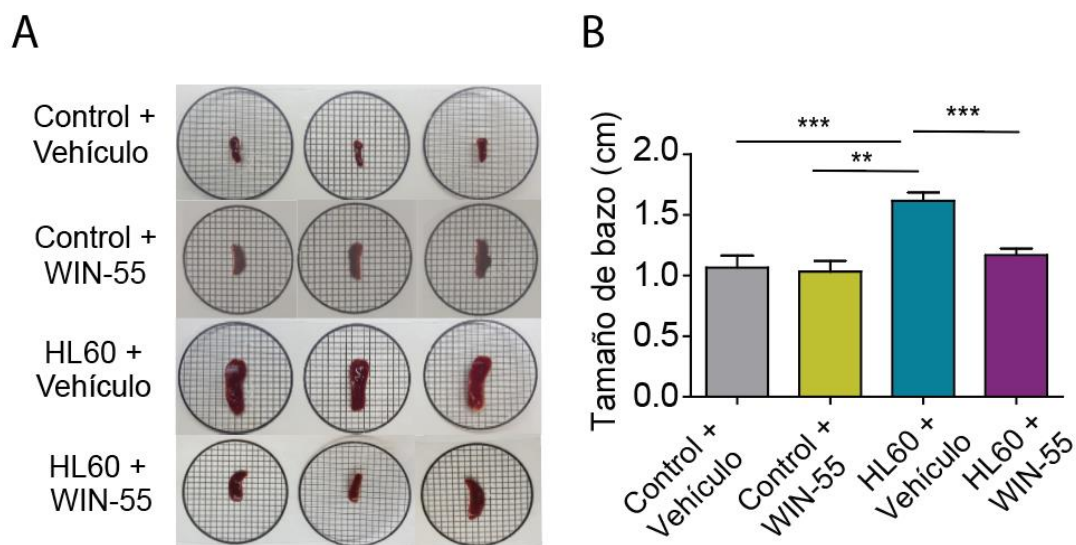


Figura 52. A) Imagen representativa del tamaño medio de los bazos en cada grupo tras 5 días de tratamiento. B) Cuantificación media de las medidas tomadas a todos los ratones expresadas en cm. Se usaron n=7 ratones en cada condición. ** indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,005$ y *** $p \leq 0,0005$

Observamos un aumento estadísticamente significativo del tamaño del bazo en ratones con el xenoinjerto de HL60 tratados con vehículo frente a ratones de los grupos controles sin enfermedad, mientras que los xenoinjertos de HL60 tratados con WIN-55 presentaron un tamaño del bazo similar a los del grupo control, lo que coincide con los datos que muestran una infiltración menor de células humanas en bazo tras el tratamiento con el cannabinoide.

Por otro lado, para poder monitorizar la progresión de la LMA en los mismos individuos a diferentes tiempos sin necesidad de sacrificarlos, se generó un modelo que permitiese estudiar la infiltración tumoral mediante ensayos de bioluminiscencia. Para ello, se usó un modelo de xenoinjerto con células HL60 que expresaban luciferasa.

Una vez que se confirmó un foco de infiltración en la MO, los ratones se asignaron arbitrariamente a 2 grupos: tratados con vehículo o tratados con WIN-55 (5 mg/kg/día) (Figura 53).

Además, los niveles de bioluminiscencia de los ratones estudiados se cuantificaron y se representó el valor promedio de los mismos (Figura 54), los cuales indican una reducción de la intensidad de la señal en los ratones tratados con WIN-55 frente a los tratados con vehículo.

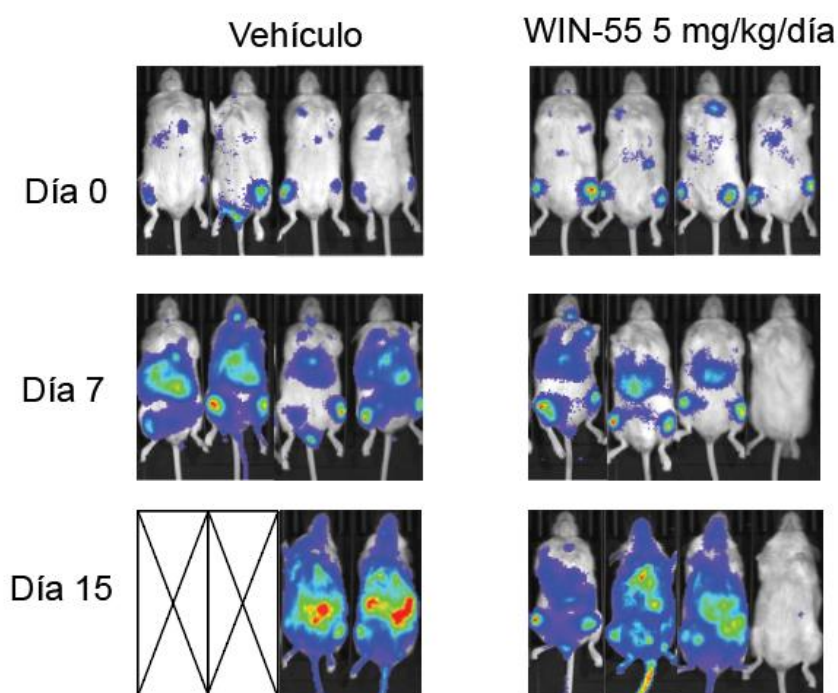


Figura 53. Modelo murino xenoinjertado con células HL60-Luciferasa. La infiltración se determinó mediante bioluminiscencia tras la inyección con luciferina. Una vez se confirmó un foco de infiltración en la MO, los ratones se asignaron arbitrariamente a 2 grupos: tratados con vehículo o tratados con 5 mg/kg/día WIN-55.

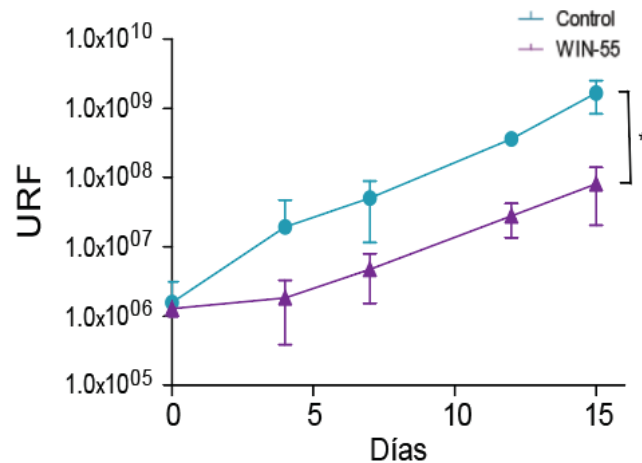


Figura 54. Cuantificación de la intensidad de bioluminiscencia de los ratones tratados con vehículo (línea azul) frente a los tratados con WIN-55 (línea morada) expresadas en unidades relativas de fluorescencia (URF).

Por otro lado, para estudiar el efecto de WIN-55 en la supervivencia global de los ratones xenoinjertados con HL60, los ratones que recibieron WIN-55 se compararon con un grupo control que recibió vehículo, y con otro grupo que fue tratado con citarabina (ARA-C).

Tras los distintos tratamientos, observamos una supervivencia significativamente mayor entre los ratones tratados con WIN-55 en comparación con el grupo de control ($p \leq 0,0001$) y el grupo tratado con ARA-C ($p \leq 0,005$), siendo las medianas de supervivencia para el grupo control de 5 días, para ARA-C de 11 días y para WIN-55 de 18 días (Figura 55).

Adicionalmente, determinamos el perfil de toxicidad de WIN-55 en la hematopoyesis sana, mediante el tratamiento de ratones BALB/c con WIN-55 (5 mg/kg/día durante 7 ó 28 días) y se estudiaron las frecuencias de subpoblaciones celulares presentes en SP mediante recuento celular en hemograma (Figura 56) y las de progenitores hematopoyéticos en MO mediante citometría de flujo (Figura 57).

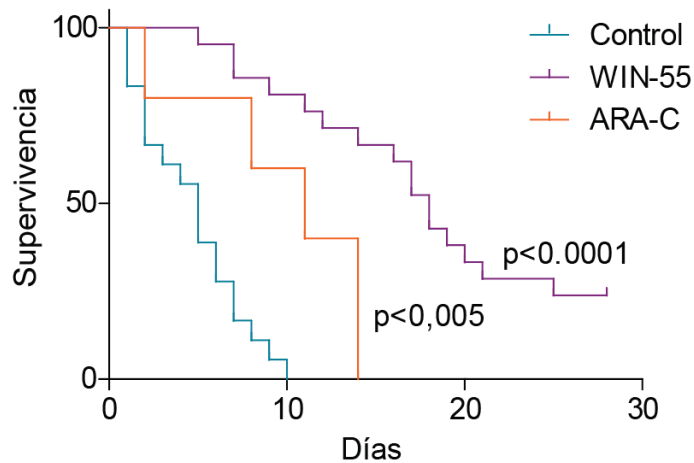


Figura 55. Gráfica Kaplan-Meier que representa la supervivencia de ratones tratados con el cannabinoide WIN-55 a una dosis de 5 mg/kg/día (n=21) en comparación con el grupo control tratado con vehículo (n=18) y el grupo tratado con ARA-C a 50 mg/kg durante 5 días (n=10).

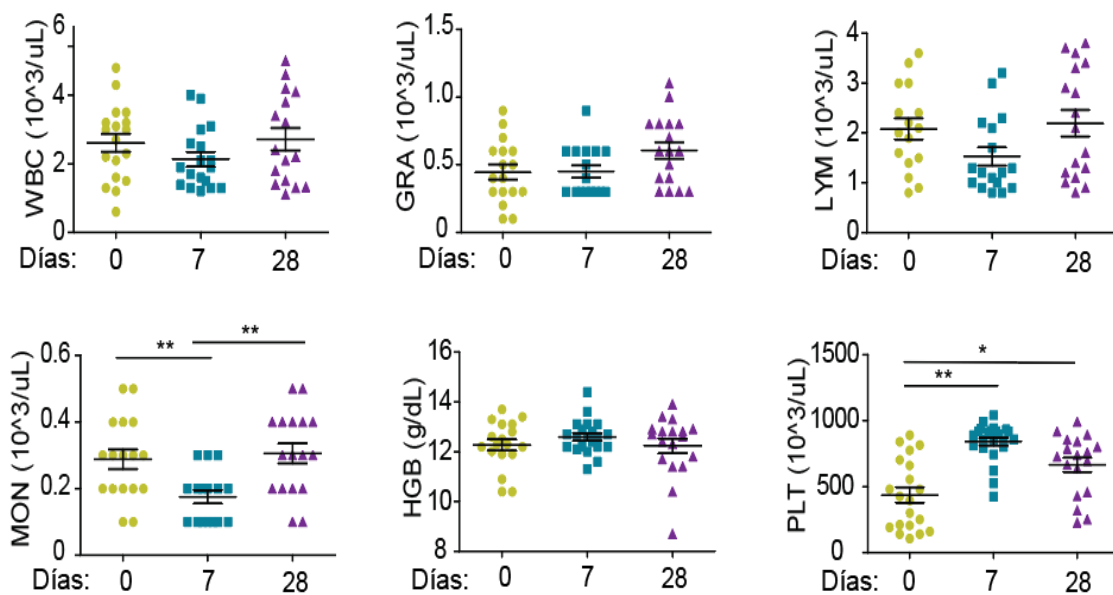


Figura 56. Análisis de los recuentos de células de SP en ratones BALB/c control o expuestos a 5 mg/kg/día de WIN-55 durante 7 o 28 días. En todas las condiciones donde no se detalla la significancia estadística es porque los datos no fueron significativos. Se estudiaron los WBC (glóbulos blancos), GRA (granulocitos), LYM (linfocitos), MON (monocitos), HGB (hemoglobina) y PLT (plaquetas).

El análisis de las poblaciones celulares de SP revelaron una leve disminución de los monocitos tras 7 días de tratamiento, que volvieron a los niveles normales a los 28

días, y un aumento en el recuento de plaquetas con el tratamiento con WIN-55, mientras que no se observaron cambios significativos para el resto de las células sanguíneas.

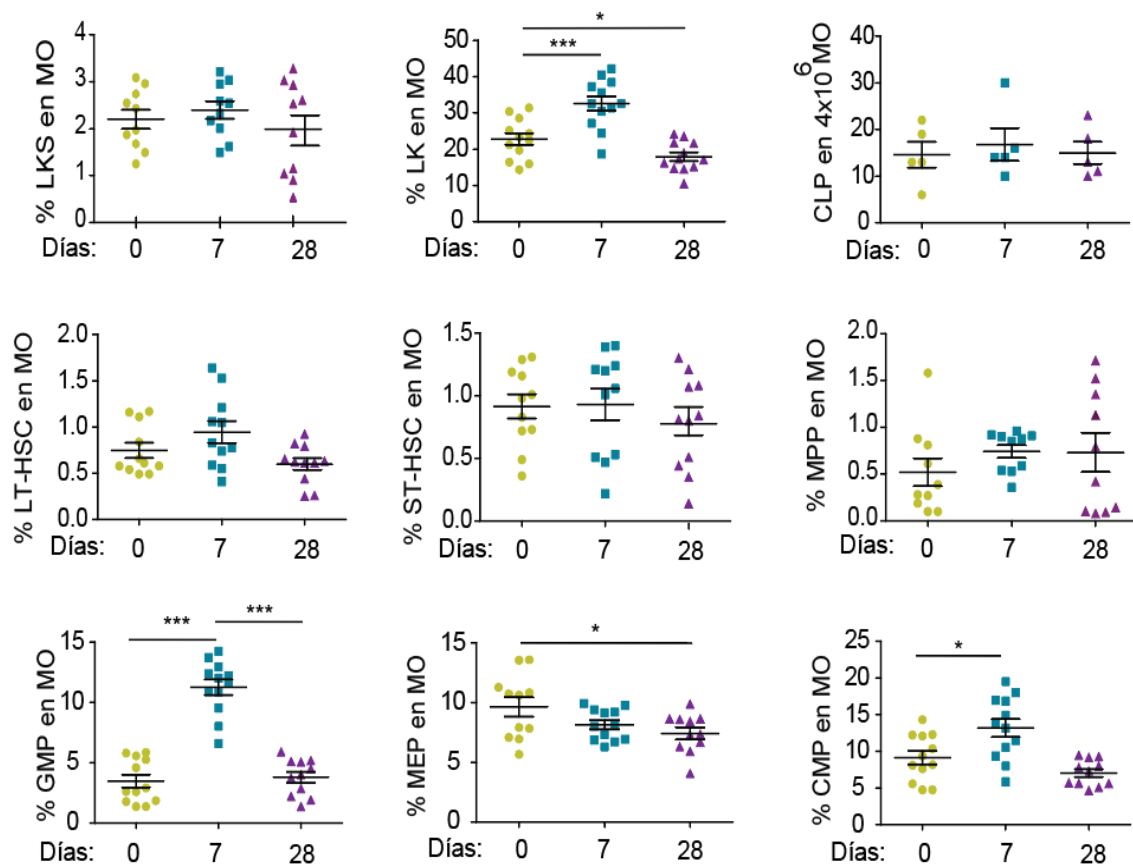


Figura 57. Gráficas de puntos que representan los porcentajes de células de las diferentes subpoblaciones identificadas en la fracción Lin⁻ de la MO después del tratamiento con vehículo o WIN-55 durante 7 y 28 días. Analizamos las subpoblaciones de células LKS de la médula ósea (poblaciones de LKS de largo plazo (LT-HSC), de corto plazo (ST-HSC) y de progenitores multipotentes (MPP)), las subpoblaciones de LK (progenitor común mieloide (CMP), progenitores megacariocito/eritroides (MEP) y población de progenitores de granulocitos/ macrófagos (GMP)) y los progenitores comunes linfoides (CLP) mediante citometría de flujo. En todas las condiciones donde no se detalla la significancia estadística es porque los datos no fueron significativos. Los porcentajes hacen referencia a la fracción Lin⁻ de la MO.

Así, pudimos confirmar que el tratamiento con WIN-55 no indujo cambios significativos en las poblaciones LKS y CLP, sugiriendo que las dosis usadas no

presentan citotoxicidad ni en los progenitores hematopoyéticos más inmaduros ni en el progenitor linfoide común. Se observó también un aumento de las células LK totales después de 7 días de tratamiento, que se correspondió con el crecimiento en las subpoblaciones GMP y CMP. Este incremento mostrado a los 7 días no se observó tras 28 días de tratamiento, en el cual, los niveles de las poblaciones fueron los mismos que los del grupo control. Después de 28 días de tratamiento con WIN-55, se observó una ligera disminución en el número de células LK totales, que se atribuyó a la subpoblación MEP. Estos datos sugieren que el tratamiento con 5 mg/kg/día de WIN-55 a largo plazo es seguro para las distintas subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos presentes en la MO y no afecta por tanto la viabilidad de las células hematopoyéticas sanas *in vivo*.

Finalmente, para evaluar si el efecto proapoptótico de los cannabinoides podría estar relacionado con la capacidad de proliferación celular, se trataron ratones BALB/c con G-CSF (para promover la división celular) solo o en combinación WIN-55. Para ello, los ratones sanos recibieron durante 3 días una inyección intraperitoneal de G-CSF (150 µg/kg/día) más vehículo ó de G-CSF (150 µg/kg/día) en combinación con WIN-55 (5 mg/kg/día). WIN-55 o el vehículo se administraron 4 días adicionales hasta llegar al día 7. Posteriormente, las diferentes subpoblaciones celulares presentes en SP se analizaron mediante recuento celular en hemograma, o las poblaciones de progenitores hematopoyéticos en MO mediante citometría de flujo.

Los estudios de poblaciones celulares de sangre periférica revelaron un aumento de granulocitos y monocitos después del tratamiento con G-CSF, que no se vio afectado con la combinación con el cannabinoide WIN-55 (Figura 58).

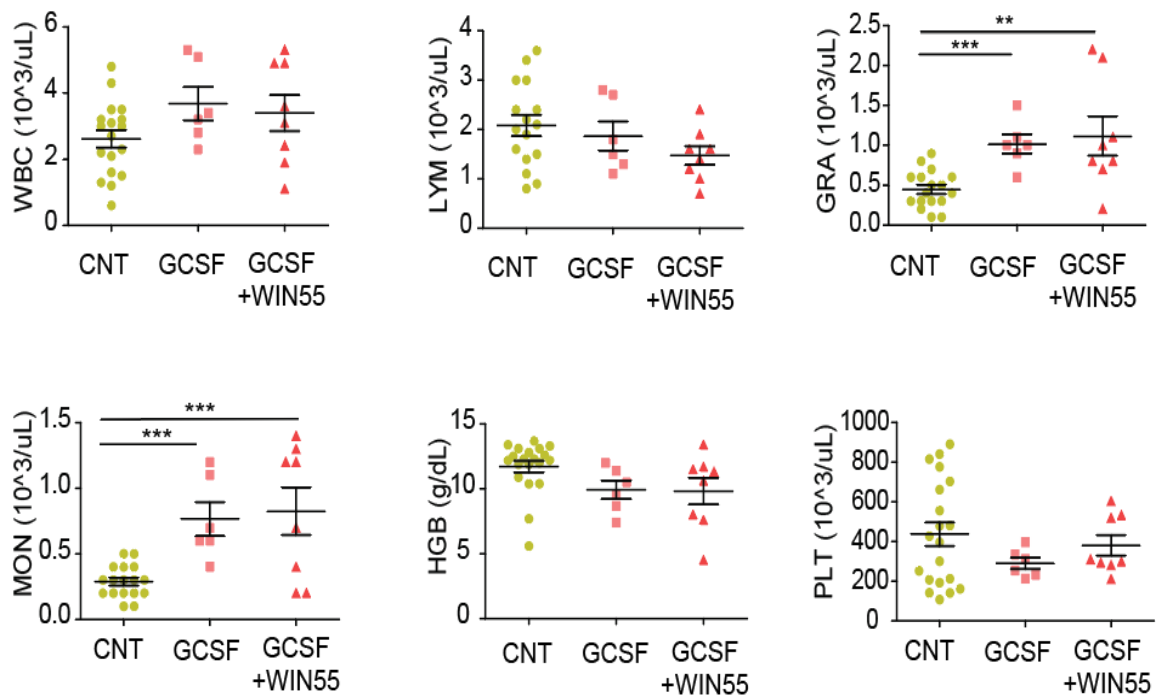


Figura 58. Análisis de los recuentos de células de SP en ratones BALB/c control (n=19), expuestos a 150 µg/kg/día de G-CSF más vehículo durante 3 días y sólo vehículo hasta llegar al día 7 (n=6), o G-CSF más 5 mg/kg/día de WIN-55 (n=8) durante 3 días y sólo 5 mg/kg/día de WIN-55 hasta el día 7. En todas las condiciones donde no se detalla la significancia estadística es porque los datos no fueron significativos. Se estudiaron los WBC (glóbulos blancos), GRA (granulocitos), LYM (linfocitos), MON (monocitos), HGB (hemoglobina) y PLT (plaquetas).

Con respecto a las poblaciones de HSC, G-CSF aumentó las poblaciones totales de LK y LKS (Figura 59). Pero mientras que en las distintas subpoblaciones de LK la combinación con WIN-55 no modificó el efecto producido por el G-CSF, en la subpoblación de células LKS LT-HSC y ST-HSC se apreció un descenso en dichas células tras el tratamiento combinado de ambos fármacos.

Esto podría deberse a que las células presentes en la SP son células diferenciadas y no proliferantes, por lo que no existen cambios tras el tratamiento.

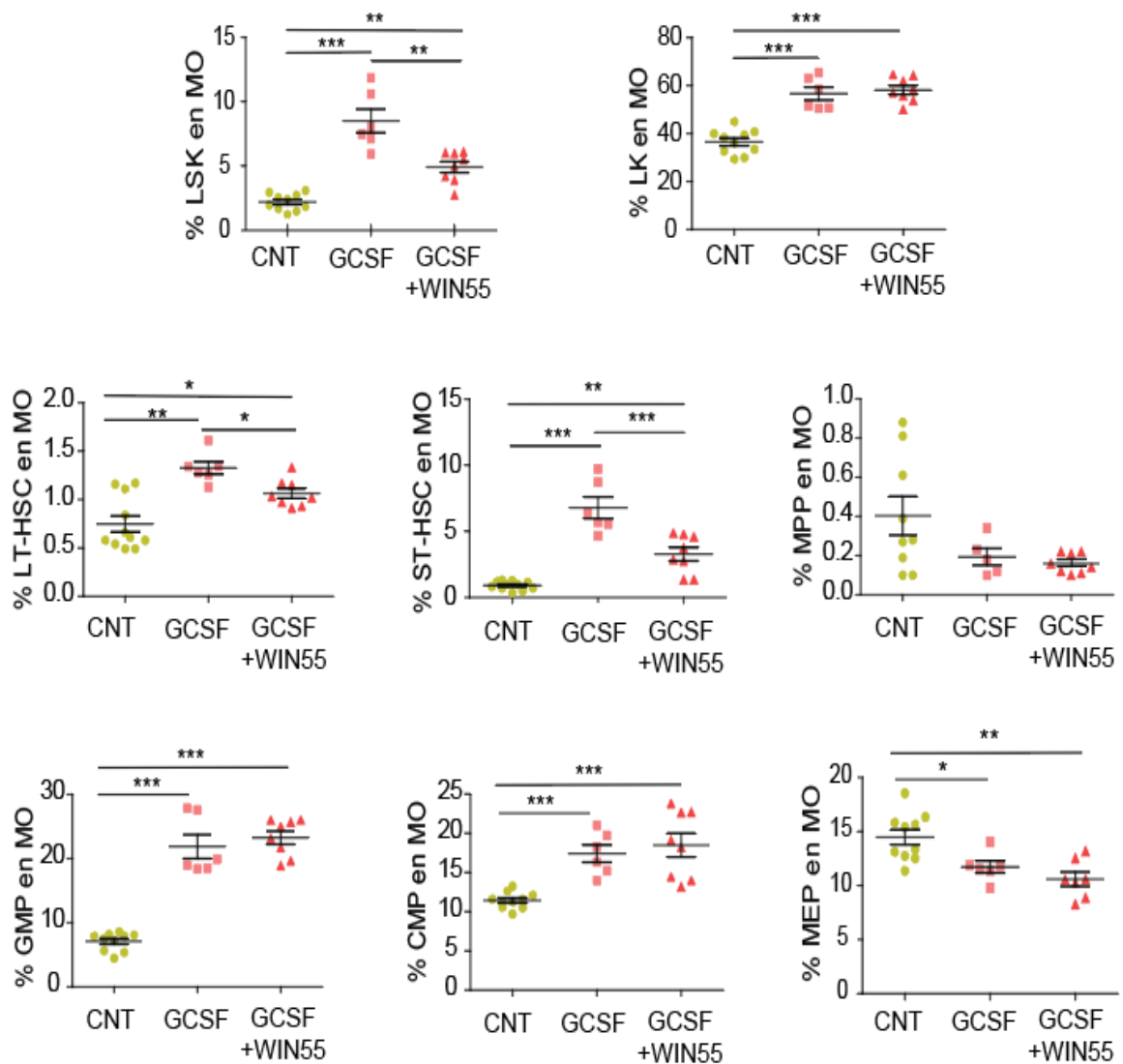


Figura 59. Porcentaje de subpoblaciones de progenitores presentes en la fracción Lin⁻ de la MO después del tratamiento con vehículo (CNT), 150 µg/kg/día de G-CSF más vehículo durante 3 días y sólo vehículo hasta llegar al día 7 (n=6), o G-CSF durante 3 días y luego 5 mg/kg/día de WIN-55 hasta el día 7 (n=8). Analizamos las subpoblaciones de células LKS presentes en la médula ósea (poblaciones de LKS de largo plazo (LT-HSC), de corto plazo (ST-HSC) y de progenitores multipotentes (MPP)), las subpoblaciones de LK (progenitor común mieloide (CMP), progenitores megacariocito/eritroides (MEP) y población de progenitores de granulocitos/macrófagos (GMP)) y los progenitores comunes linfoides (CLP) mediante citometría de flujo. En todas las condiciones donde no se detalla la significancia estadística es porque los datos no fueron significativos. Los porcentajes hacen referencia a la fracción Lin⁻ de la MO.

Sin embargo, en las poblaciones de HSC de la MO, que son poblaciones más dinámicas, sí se aprecia que el efecto de G-CSF sobre la proliferación de las células LT-HSC y ST-HSC se suprime por la adición de WIN-55, bien porque WIN-55 esté actuando afectando la viabilidad de las células más proliferantes o que esté afectando al proceso de diferenciación celular de las HSC.

5.2.6. WIN-55 desregula procesos biológicos cruciales en las células de LMA.

Para dilucidar las vías de señalización implicadas en el efecto antileucémico de WIN-55, realizamos un análisis de la expresión génica mediante microarrays en células HL60 tras el tratamiento con WIN-55 (la lista completa de genes afectados usando como criterio un Fold Change mayor a +/-2 se muestra en el Anexo I).

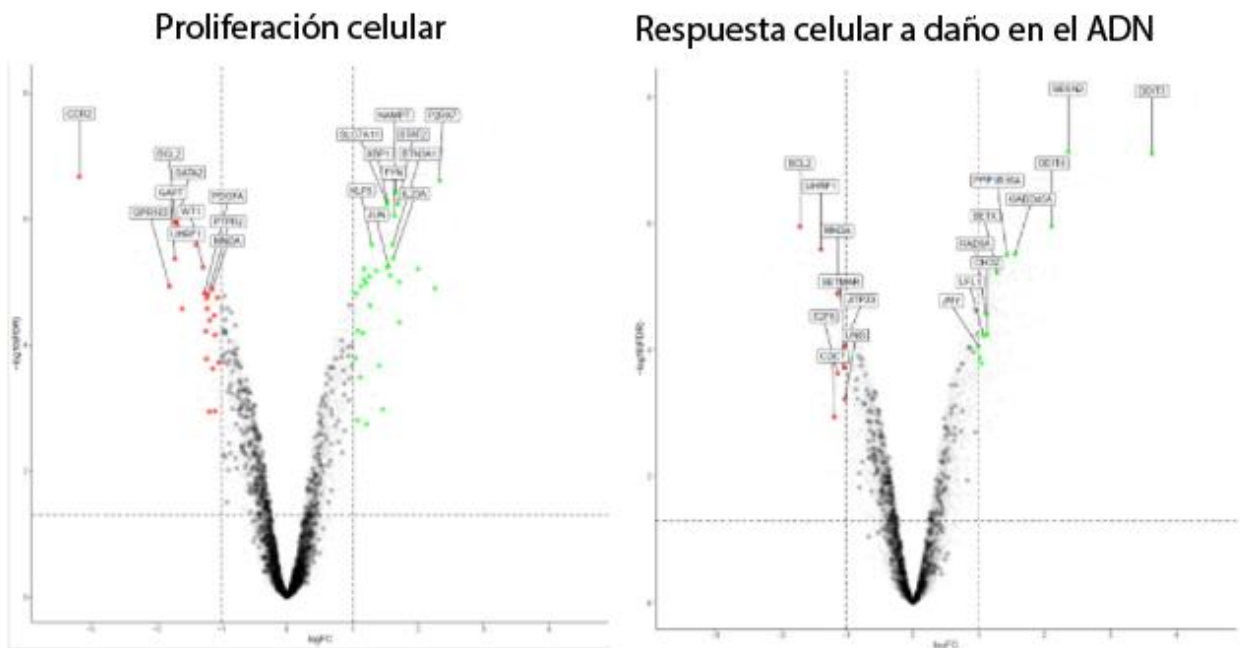
Tabla 5. Vías desreguladas afectadas tras el tratamiento de la línea HL60 con WIN-55

ID	Descripción	NES	FDR	Tamaño del conjunto de genes	Nº de genes sobreexpresados	Nº de genes regulados a la baja
GO:0034976	Respuesta a estrés del RE	2,80682166	9,92E-33	283	42	1
GO:0008152	Procesos metabólicos	1,32629702	1,82E-26	10815	169	70
GO:0006281	Respuesta celular a daño en el ADN	1,62457259	1,68E-07	525	4	5
GO:0007005	Organización mitocondrial	1,60948036	3,77E-07	510	9	3
GO:0008283	Proliferación celular	1,29792253	3,20E-06	1837	32	23

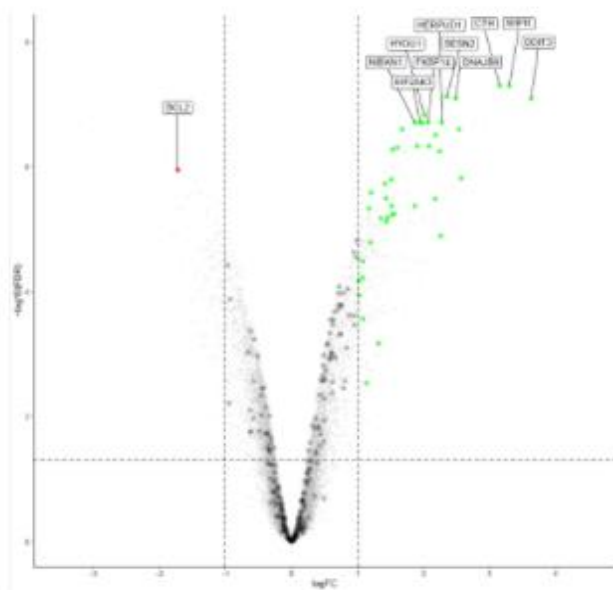
Tabla 5. Vías celulares desreguladas en presencia de WIN-55 detectadas en base al sistema de clasificación de ontología genética (GO) y utilizando el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) de los resultados obtenidos tras el estudio de microarrays de células HL60 tratadas durante 6 horas con 50 µM de WIN-55 frente a células control. (NES: Normalized enrichment score, FDR: False discovery rate)

La agrupación de los genes expresados diferencialmente en procesos biológicos, basados en el sistema de clasificación de ontología genética (GO) y utilizando el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA), reveló un enriquecimiento significativo de genes regulados hacia arriba o hacia abajo asociados con distintos procesos biológicos, como la respuesta a estrés del RE (regulación positiva), proceso metabólico (regulación negativa), reparación del ADN (regulación negativa), organización de la mitocondria (regulación negativa) o proliferación celular (regulación negativa) (Tabla 5 y Figura 60).

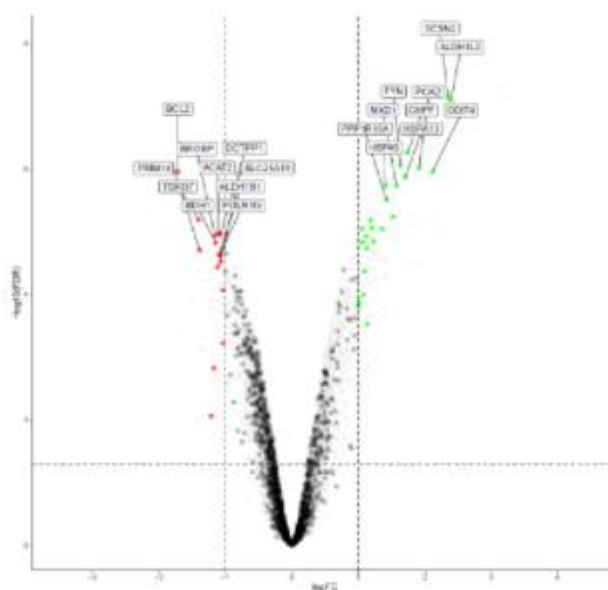
Así, este análisis indica que WIN-55 desregula los procesos recién mencionados, razón por la cual podría producir el efecto antileucémico en las células de LMA y por ello procedimos a estudiar cada uno de estos procesos.



Respuesta a estrés del RE



Mitocondria



Procesos metabólicos

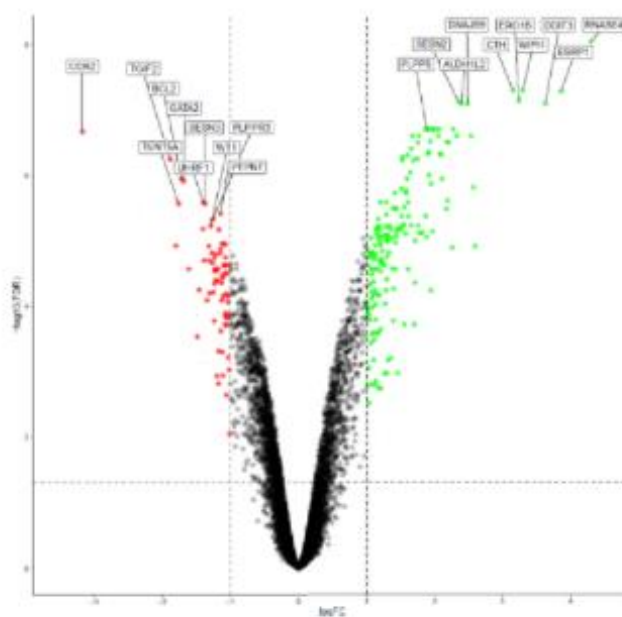


Figura 60. Resumen de las principales vías alteradas y los genes afectados en cada una de ellas tras realizar un estudio por microarrays de células HL60 tratadas durante 6 horas con 50 μ M de WIN-55 frente a células control.

5.2.7. WIN-55 afecta a las principales vías de proliferación e induce apoptosis mediada por caspasas.

La regulación de AKT, ERK1/2, JNK y p38 juegan un papel fundamental en la supervivencia celular o apoptosis (Gómez Del Pulgar et al., 2000; Herrera et al., 2005). Por lo tanto, examinamos si la exposición a WIN-55 alteraba los niveles de las formas fosforiladas de estas quinasas de señalización.

Las células HL60 se expusieron a WIN-55 (50 μ M, durante 2, 6, 18 y 24 h). Los ensayos de Western blot demostraron que el tratamiento con WIN-55 regulaba ligeramente al alza p-JNK y p-Erk1/2 al igual que ocurría en las células de MM, mientras que p-p38 y p-AKT se regulaban moderadamente a la baja a lo largo del tiempo (Figura 61).

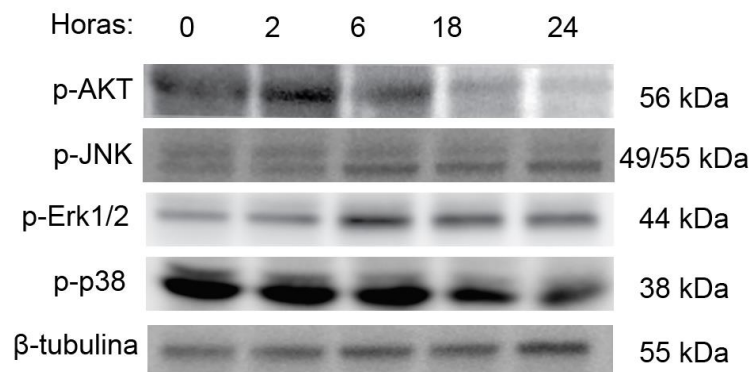


Figura 61. Estudio de la activación mediante fosforilación de diferentes proteínas implicadas en las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt tras incubación con WIN-55 (50 μ M) durante distintos periodos de incubación (0-24 horas) mediante Western blot. Se usó la expresión de β -tubulina como control de carga.

La vía de PI3K/AKT se encarga de modular la proliferación celular mientras que las quinasas JNK (también conocidas como Stress-Activated Protein Kinase) actúan en respuesta a una señal de estrés, por lo que podríamos afirmar que WIN-55 suprime las vías de inducción de proliferación celular mientras que aumenta la expresión de proteínas de respuesta a estrés.

Por otro lado, estudiamos la activación de las caspasas implicadas en este proceso después del tratamiento con WIN-55. De acuerdo con los estudios del proceso de apoptosis mediante citometría de flujo, se determinó la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis celular en células HL60 expuestas a WIN-55 (50 μ M o vehículo durante 2, 6, 18 y 24 h) mediante Western blot (Figura 62).

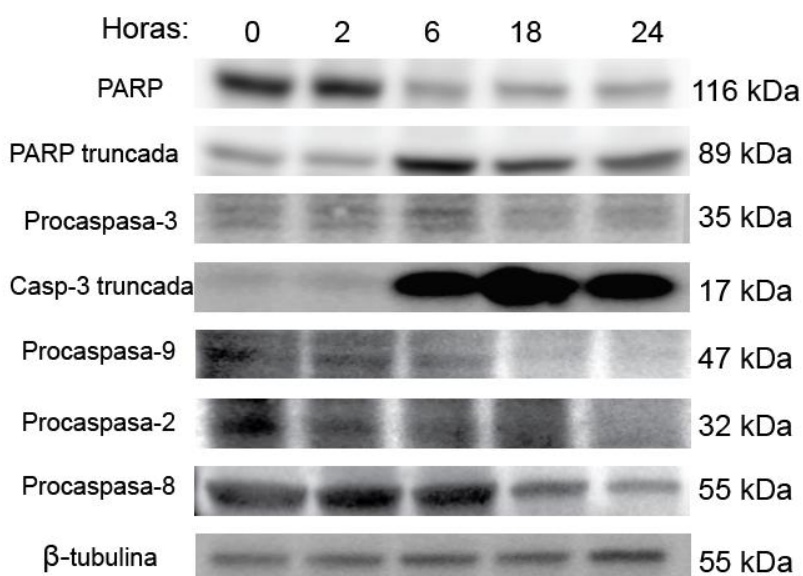


Figura 62. Las células HL60 se incubaron con 50 μ M de WIN-55 en el período de tiempo indicado y la expresión de las formas escindidas o truncadas de la caspasa 3 y la fragmentación de su sustrato PARP se analizaron mediante Western blot. La expresión de las caspasas iniciadoras principales, Casp-9, Casp-2 y Casp-8 también se estudiaron. Se usó la β -tubulina como control de carga.

Los resultados obtenidos muestran que la exposición a WIN-55 provocó la activación de caspasas. Más específicamente, observamos la escisión de la caspasa-3 y su sustrato PARP y la acumulación de sus formas activas, a la vez que se observó una reducción de la procaspasa-2, -8 y -9, hecho que sucede cuando se activan. Esto indica que WIN-55 activa las vías apoptóticas tanto intrínsecas como extrínsecas.

Para investigar más a fondo la importancia de las caspasas en el efecto citotóxico de los cannabinoides, se evaluó la capacidad del inhibidor pancaspasa Z-VAD(OMe)-

FMK para suprimir el proceso de muerte celular inducida por WIN-55. Las células se preincubaron durante 1 hora con Z-VAD(OMe)-FMK y posteriormente se añadió WIN-55 o vehículo durante 18 h. Como se muestra en la figura 63, el efecto proapoptótico de los cannabinoides en las células de LMA disminuyó significativamente tras la co-incubación con el inhibidor de pancaspasas.

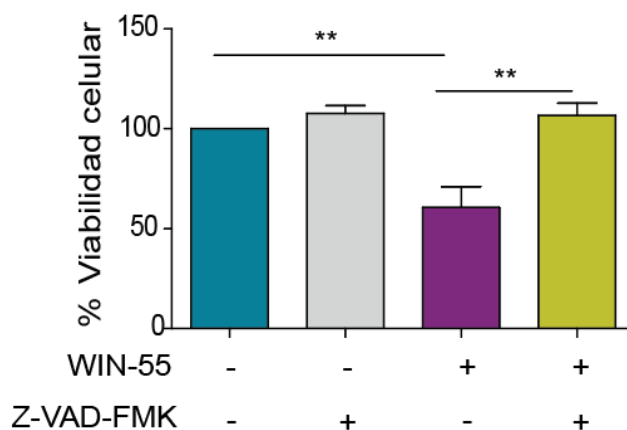


Figura 63. Se incubaron células HL60 con vehículo, 5 μ M de WIN-55, 10 μ M del inhibidor pancaspasa Z-VAD(OMe)-FMK o en presencia de ambos compuestos. Después de 18 h, se analizó la viabilidad celular mediante Cell Counting Kit-8.

En resumen, nuestros resultados proporcionan evidencias de que el compuesto cannabinoide WIN-55 induce la muerte celular mediada por apoptosis mediante la activación de las vías intrínseca y extrínseca.

5.2.8. WIN-55 no provoca un daño directo en el ADN, pero PARP1 ejerce un papel importante en el efecto producido por las células de LMA.

Para comprobar si WIN-55 actuaba produciendo daño en el ADN, estudiamos dos mecanismos implicados en este proceso, como es el aumento de la fosforilación de la proteína H2AX y la acumulación de poly-(ADP-ribosa) (o PAR), producto de la actividad de la enzima PARP1, mediante inmunofluorescencia.

En este caso, el aumento de la fosforilación de la serina 139 de γ -H2AX y de la PARylación de proteínas nucleares, eventos clave en la señalización de la presencia de daño en el ADN aumentó (Figura 64 y 65), pero este efecto se atribuyó a un efecto indirecto sobre las células apoptóticas tras la incubación con altas dosis de WIN-55 más que a un efecto generalizable de daño en el ADN inducido por WIN-55.

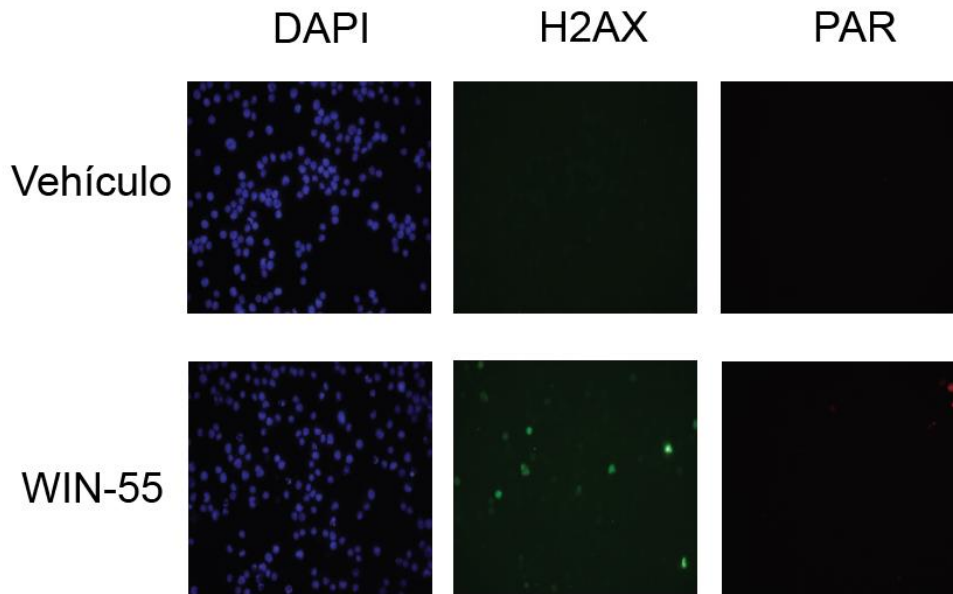


Figura 64. La expresión de H2AX y PAR se midió mediante análisis de inmunocitofluorescencia a las 6 horas después del tratamiento con WIN-55.

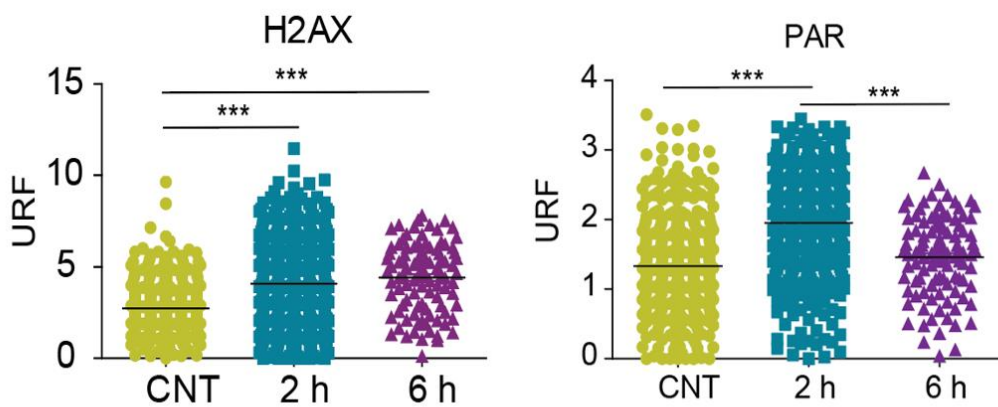


Figura 65. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia observada en el análisis de inmunocitofluorescencia que se muestra en la Figura 64.

Finalmente, para descartar un efecto de WIN-55 como inductor de cortes de doble cadena en el ADN, daño que activa la fosforilación de la serina 139 en γ -H2AX, analizamos la sinergia en la letalidad celular tras la preincubación con Olaparib, un inhibidor de PARP1. Si el incremento de señal en ser139-H2AX tras el tratamiento con WIN-55 se debe a una deficiencia intrínseca del proceso de recombinación homóloga en las células de LMA, y a la generación de cortes de cadena sencilla por la acción de WIN-55 y su posterior conversión a cortes de doble cadena tras la replicación, es esperable que WIN-55 sea sinérgico con el inhibidor de PARP Olaparib. Sorprendentemente obtuvimos el efecto contrario. Olaparib revirtió casi en su totalidad la muerte causada por WIN-55 (Figura 66), lo que sugiere que durante el tratamiento con WIN-55 PARP1 presenta una función importante durante el proceso apoptótico mas que durante el proceso de reparación del ADN.

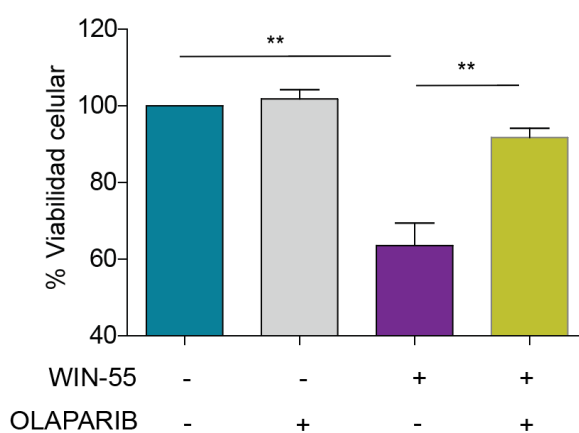


Figura 66. La supervivencia celular de las células HL60 se determinó después de la incubación con WIN-55 10 μ M, Olaparib 10 μ M o ambos mediante ensayos de viabilidad con el Cell Counting Kit-8 tras 18 horas de incubación.

Tras comprobar la importante implicación de PARP en el efecto antileucémico provocado por WIN-55, nos propusimos estudiar si existía una correlación entre la

sensibilidad al tratamiento y los niveles de expresión basal de ARNm de PARP1 en los pacientes de LMA estudiados (Figura 67).

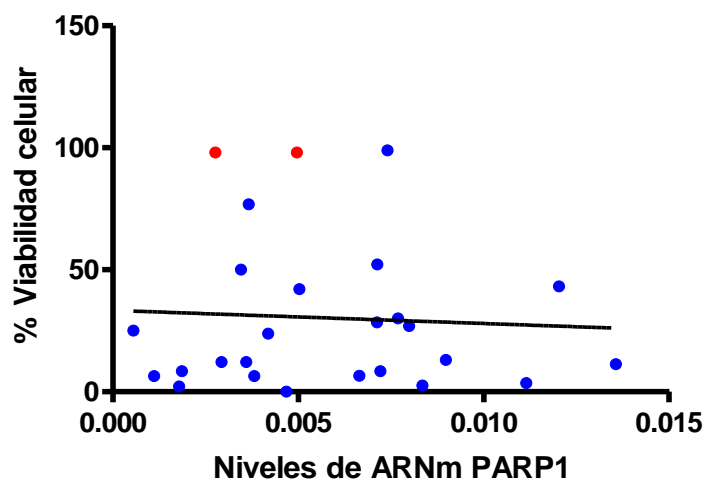


Figura 67. Correlación entre viabilidad celular tras tratamiento con WIN-55 (50 μ M) y niveles de ARNm de PARP1 en muestras de pacientes con LMA estudiadas al diagnóstico con más de un 75% de blastos (Azul) o CD34+ de donantes sanos (Rojo).

Estos resultados indican que no existe una clara correlación entre la expresión de PARP1 en pacientes de LMA y el grado de sensibilidad a WIN-55.

5.2.9. WIN-55 induce daño en organelas como el retículo endoplasmático y la mitocondria.

Nuestro estudio transcriptómico muestra que la vía celular más afectada por el tratamiento con WIN-55 son las vías de estrés del RE y la de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Por tanto, para validar nuestros datos analizamos la activación de algunas de las proteínas principales de estas vías, como son las fosforilaciones de p-PERK, p-IRE1 o la acumulación de CHOP mediante Western blot (Figura 68).

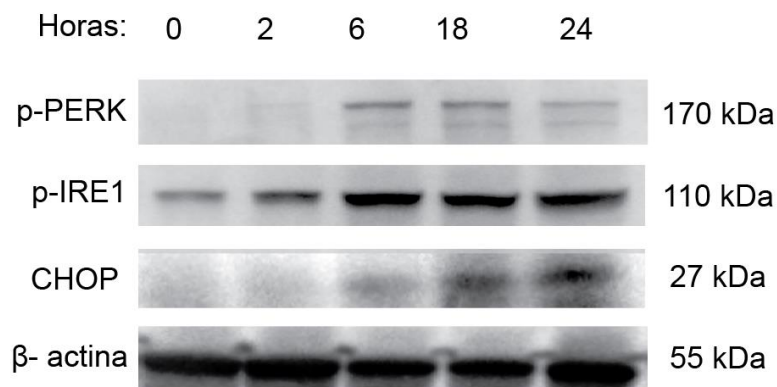


Figura 68. Estudio de la expresión de proteínas implicadas en la UPR. Se trataron células HL60 con WIN-55 (50 μ M) durante los tiempos indicados en la parte superior del panel. Se usó la β -actina como control de carga.

Con respecto al estrés del retículo endoplásmico y la vía UPR, el tratamiento con el cannabinoide WIN-55 aumentó significativamente la fosforilación de factores clave, como p-IRE1, p-PERK y la expresión de CHOP, lo que confirma los datos obtenidos en nuestro array.

También se estudió el efecto de WIN-55 sobre la actividad funcional de las mitocondrias. La exposición de las células HL60 a 50 μ M de WIN-55 durante 15 o 30 minutos condujo a una reducción significativa del potencial de membrana mitocondrial como se muestra en la figura 69.

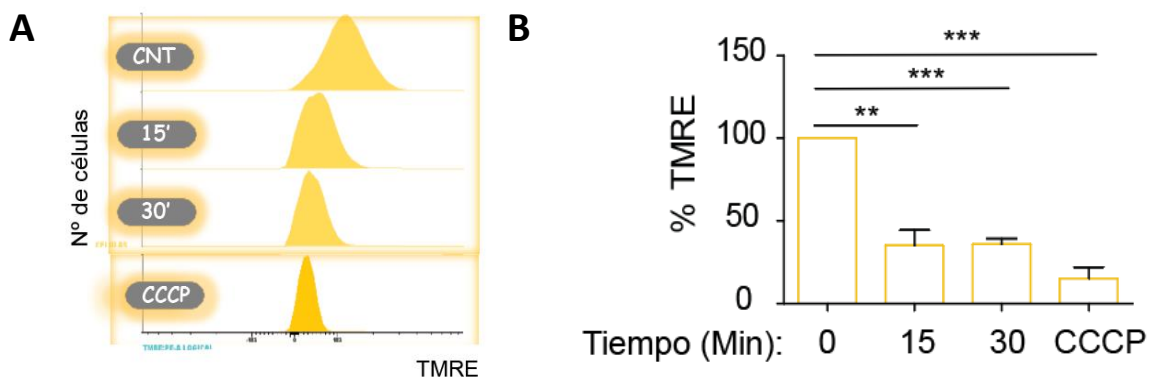


Figura 69. (A) Las células HL60 sin tratar ó tratadas con 50 μ M de WIN-55 (10^6 células por ensayo a los 15 y 30 minutos) se tiñeron con TMRE para evaluar el potencial de membrana mitocondrial

mediante FACS. Como control positivo para la pérdida de $\Delta\psi_m$ se usó CCCP. (B) Cuantificación de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial con lector de fluorescencia en placa Fluoroscán. El valor medio del control se relativizó al 100% (n=3).

También estudiamos la producción de ROS utilizando el fluorocromo MitoSox en células HL60. La exposición de HL60 a WIN-55 condujo a un aumento significativo en los niveles de ROS a los 15 minutos o más (Figura 70)

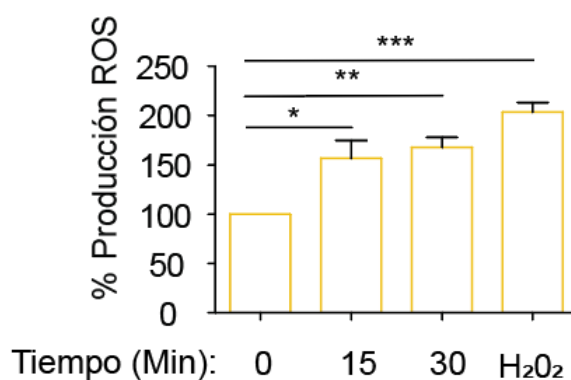


Figura 70. Las células HL60 se tiñeron con 5 μ M de la sonda MitoSOX para detectar la producción de superóxido en la mitocondria. En este caso, como control positivo de la producción de ROS se utilizó H₂O₂ y se analizó la señal con un lector de fluorescencia en placa.

Este mismo experimento se realizó con células CD34⁺ y en este caso no se detectó un aumento de la producción de ROS tras el tratamiento con WIN-55 como sucedía en las células leucémicas (Figura 71).

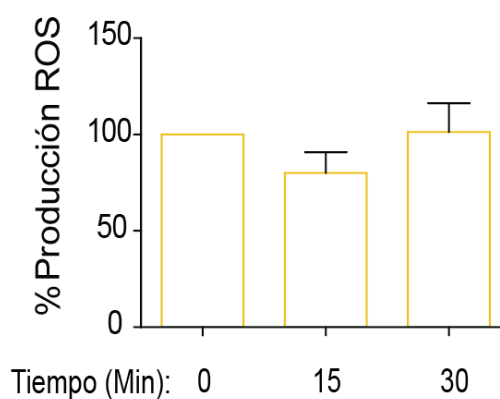


Figura 71. Las células CD34⁺ procedentes de aféresis se trataron con 50 μ M de WIN-55 durante 15 ó 30 minutos y luego se tiñeron con 5 μ M de la sonda MitoSOX para detectar la producción de superóxido mitocondrial.

Se ha descrito que PARP (Hocsak et al., 2017) juega un papel protector en las mitocondrias evitando la producción de ROS. Para evaluar si Olaparib suprimía el incremento en los niveles de ROS provocados por el tratamiento con WIN-55, llevamos a cabo tratamientos combinados. Nuestros resultados indican que las preincubaciones durante 1 hora con Olaparib (Figura 72) no suprimían el aumento de ROS provocado por WIN-55 y, por lo tanto, no actúan protegiendo contra el daño mitocondrial provocado por WIN-55.

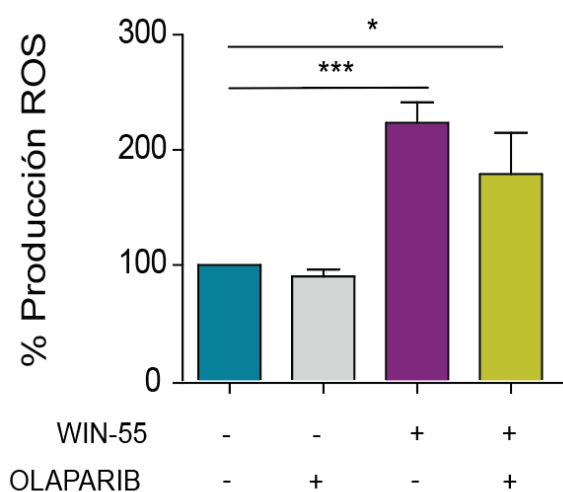


Figura 72. La producción de ROS se analizó en células HL60 usando MitoSox tras ser tratadas con 50 μ M de WIN-55 durante 30 minutos, 10 μ M de Olaparib preincubado 1 hora antes del tratamiento con el cannabinoide o ambos.

Para profundizar en el estudio mitocondrial, se analizaron la respiración basal y máxima mediante cuantificaciones de niveles del consumo de oxígeno (OCR) utilizando

el kit MitoStress y el analizador Seahorse tanto en líneas de LMA como en células sanas CD34⁺ previamente enriquecidas mediante FACS (en este caso solo fue posible analizar la respiración basal debido a la limitación de células).

Los resultados de este experimento indicaron que las células U937 (Figura 73) mostraron una disminución en ambas respiraciones después del tratamiento con WIN-55, que no fue revertida por Olaparib (incluso disminuyó más aún en el caso de la respiración basal), al igual que en el caso de la línea celular HL60 (Figura 74), aunque aquí los resultados no fueron estadísticamente significativos, debido a la mayor dispersión de los datos en la condición control.

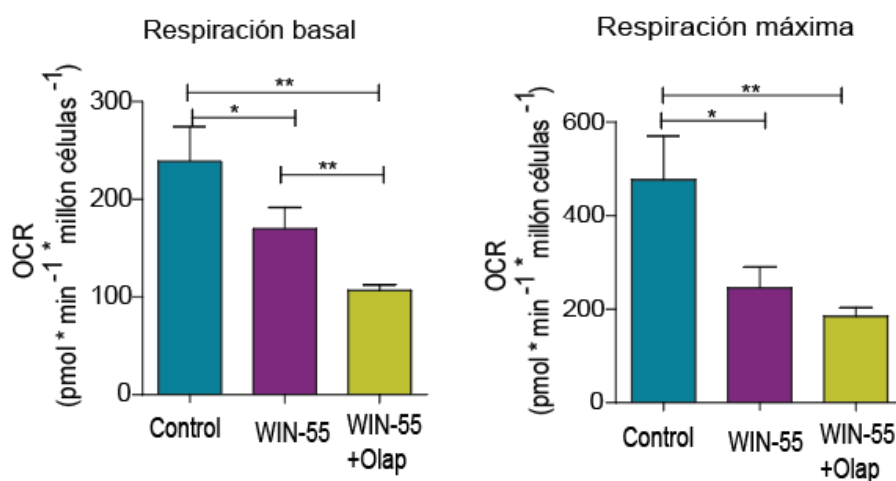


Figura 73. Los niveles de OCR se cuantificaron en células U937 después de los tratamientos con WIN-55 y / o Olaparib para determinar los niveles respiratorios basales y máximos mediante el analizador Seahorse.

Por el contrario, el OCR de las células CD34⁺ no se vio afectado después del tratamiento con WIN-55, por lo que no fue necesario comprobar si la co-incubación con Olaparib revertía los cambios producidos (Figura 75).

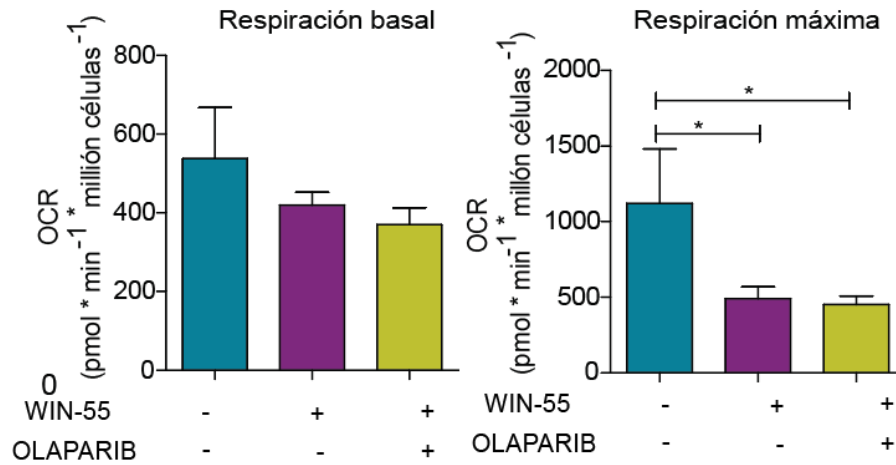


Figura 74. Niveles de OCR en las células HL60 después del tratamiento con WIN-55 y / o Olaparib mediante el analizador Seahorse.

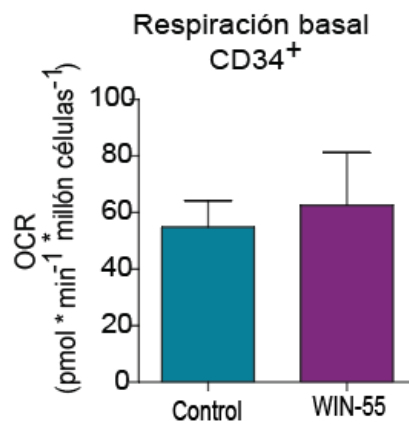


Figura 75. Niveles de OCR en las células CD34⁺ previamente sorteadas después del tratamiento con WIN-55 mediante el analizador Seahorse.

5.2.10. La apoptosis inducida por WIN-55 se correlaciona con la acumulación de ceramidas

Dado que se ha descrito la implicación de las ceramidas sintetizadas de novo en la apoptosis inducida por cannabinoides en células de glioma (Gómez del Pulgar et al., 2002), investigamos si la muerte celular inducida por WIN-55 en las células leucémicas se debía al aumento de los niveles de ceramida.

Para ello, estudiamos los niveles de ceramidas totales mediante un marcaje fluorescente mediante microscopía, mostrando que existen diferencias significativas en las cantidades de ceramidas totales en células no tratadas frente a las tratadas con cannabinoide WIN-55 por inmunofluorescencia (Figura 76).

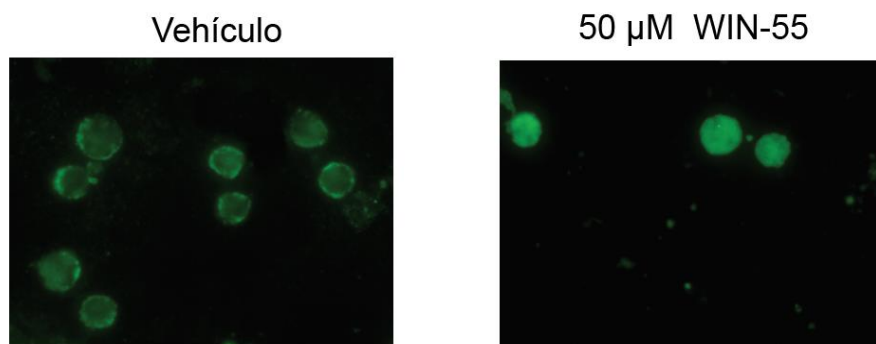


Figura 76. Inmunocitoquímica de tinción de ceramidas totales en células HL60 tratadas con el vehículo o tratadas con WIN-55 (50 μ M) durante 6 horas.

Para corroborar que los cambios que produce WIN-55 en los niveles de ceramidas es una característica general de las células leucémicas y comprobar qué subtipos concretos de ceramidas son los que se ven afectados, llevamos a cabo una determinación cuantitativa de los niveles de ceramida C16:0, C18:0, C18:1, C22:0, C24:0 y C24:1 mediante HPLC / MS-MS en las líneas celulares HL60 (Figura 77) y U937 (Figura 78).

Los datos obtenidos muestran que las ceramidas 16:0, 18:0 y 18:1 siguieron un patrón de aumento constante en todas las líneas hasta 24 horas de tratamiento, mientras que las ceramidas de cadena más larga alcanzaron su nivel máximo a las 6 horas tras la exposición alcanzando posteriormente los niveles basales.

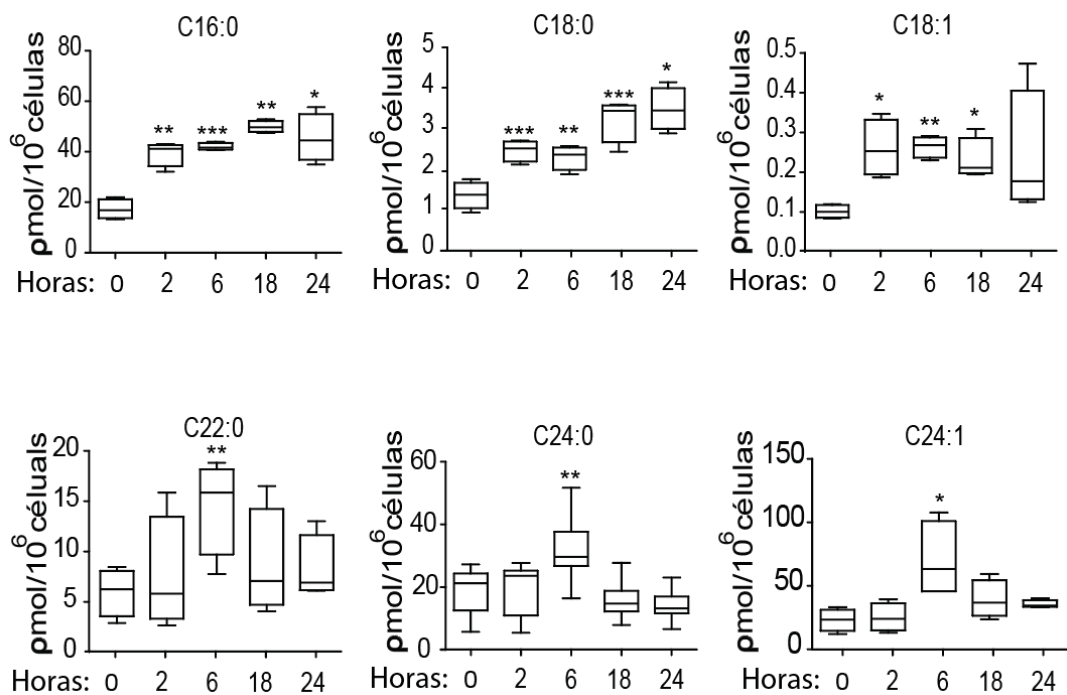


Figura 77. Las células HL60 se incubaron con WIN-55 (50 μ M) durante los tiempos indicados y los niveles de los diferentes tipos de ceramidas se cuantificaron por HPLC / MS.

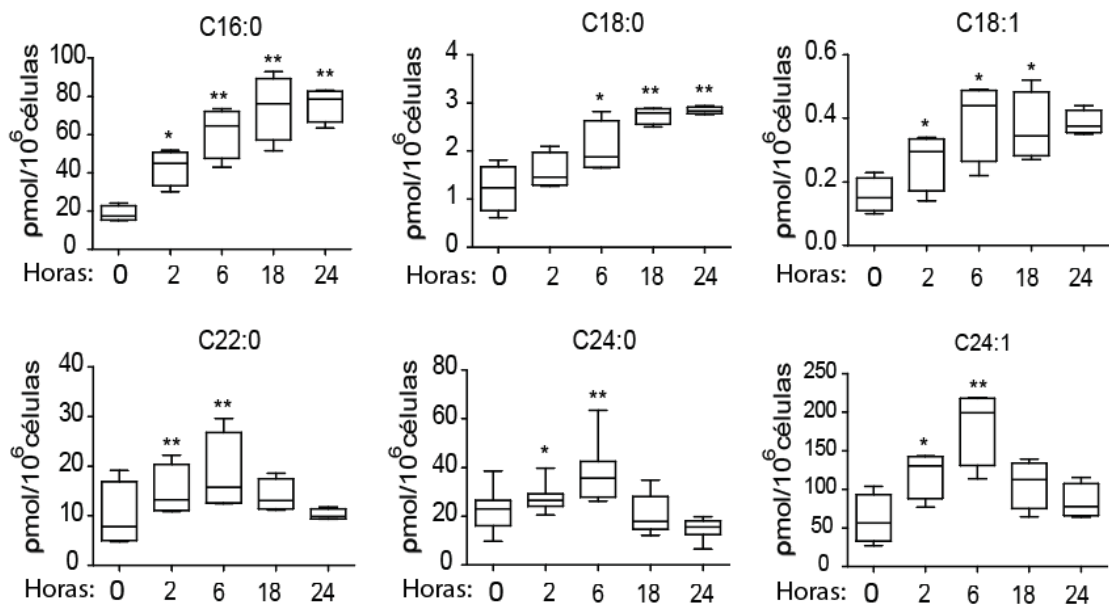


Figura 78. Cuantificación de los niveles de diferentes tipos de ceramidas mediante HPLC / MS-MS en la línea celular U937 tras la incubación con 50 μ M de WIN-55 en los tiempos indicados.

Los niveles de esfingosina-1-fosfato (S1P) y ceramida-1-fosfato (C1P) también se vieron afectados en células HL60 (Figura 79A y 79B) y U937 (Figura 80A y 80B) tras el tratamiento con WIN-55 tanto a 6 como a 18 horas. Estos datos confirman que los cannabinoides afectan significativamente al metabolismo de las ceramidas.

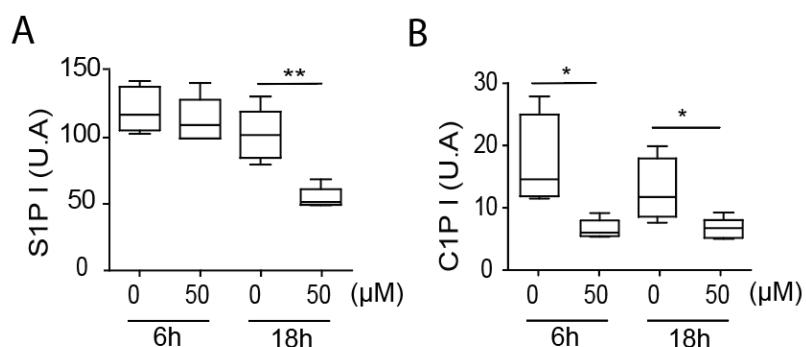


Figura 79. (A) Los niveles de S1P y (B) C1P se cuantificaron por HPLC / MS-MS en la línea HL60 mediante curvas de calibración, en las que se utilizó la ceramida 17:0 como patrón interno. Las desviaciones estándar relativas (RSD) fueron <10%.

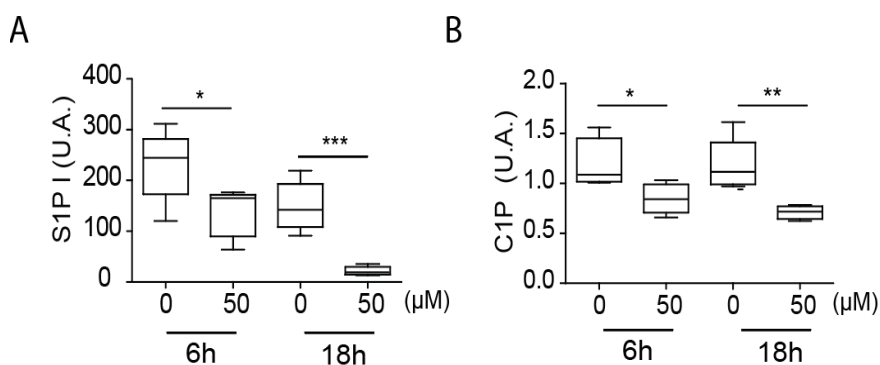


Figura 80. Las gráficas muestran los niveles de (A) S1P y (B) C1P en la línea U937 cuantificados por HPLC / MS-MS tras el tratamiento durante 6 y 18 horas de 50 μM de WIN-55.

Para confirmar que la acumulación de ceramidas es el mecanismo principal por el cual se produce el proceso apoptótico de WIN-55, y no es una consecuencia indirecta, realizamos una serie de experimentos con inhibidores selectivos de enzimas que se

encuentran implicadas en la biosíntesis de ceramidas, como la miriocina, un inhibidor de la serina palmitoiltransferasa (SPT); la fumosinina B1 (FB1), un inhibidor de la ceramida sintasa; ABC294640, PF-543 y SKI-II (inhibidores de la SphK); e inhibidores específicos de los receptores de S1P como son FTY720, Ozanimob, BAF-312, JTE-013 y Ponesimod como se muestra en el siguiente esquema (Figura 81).

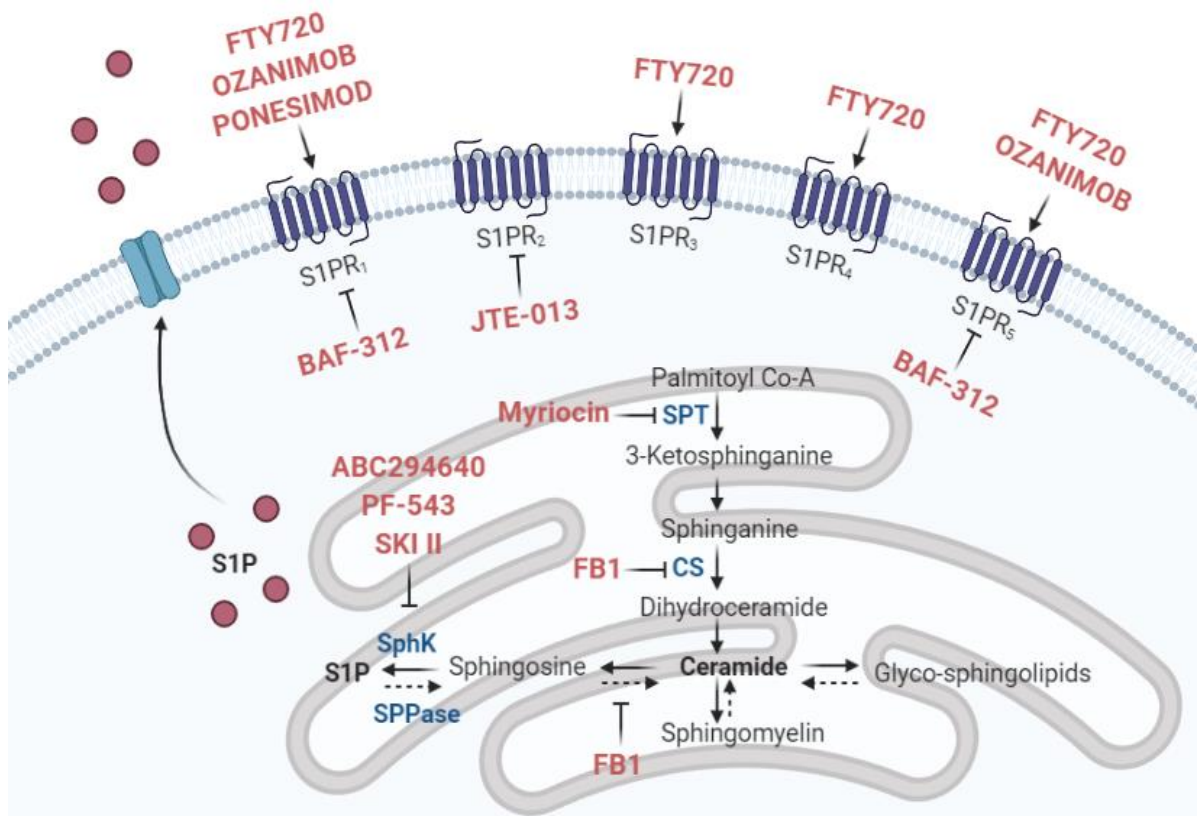


Figura 81. Esquema de la ruta de síntesis de ceramida de novo y los pasos en los que los inhibidores usados en nuestro estudio (en rojo) bloquean este proceso.

Solo el bloqueo de la síntesis de ceramidas con FB1, el inhibidor de la ceramida sintasa, previno parcialmente la disminución de la viabilidad de las células HL60 tras la exposición a WIN-55 según los resultados obtenidos mediante estudios con Cell Counting Kit-8 tras 18 h de incubación (Figura 82).

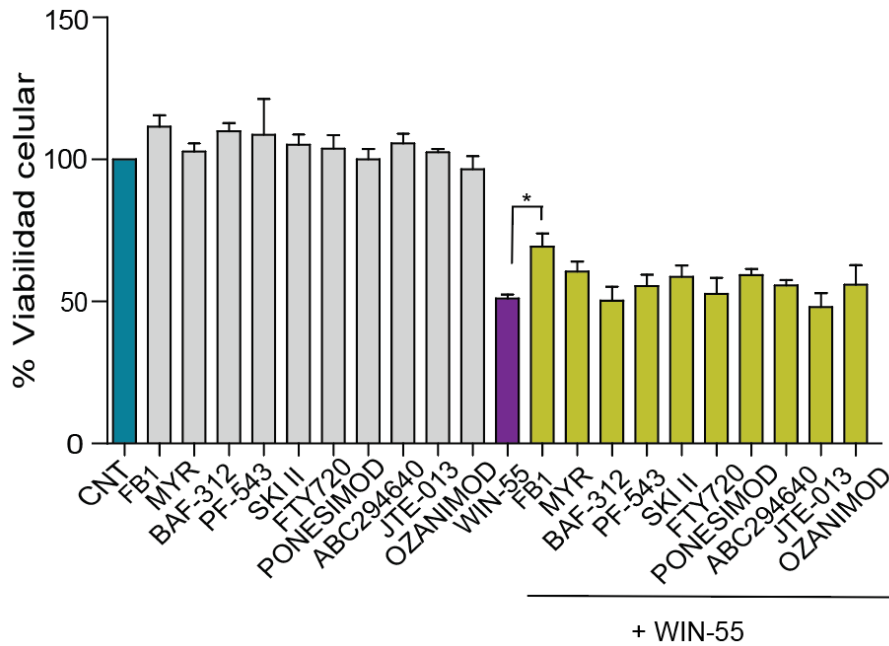


Figura 82. Gráfica de barras que muestra los resultados de viabilidad de las células HL60 en presencia de los diferentes inhibidores de ceramidas solos o en combinación con WIN-55. Se analizó la viabilidad celular por CCK-8 para confirmar la reversión de la apoptosis mediada por WIN-55. Con todos los inhibidores se realizaron curvas dosis-respuesta previas a este ensayo solos o en combinación con WIN-55 para seleccionar las mejores dosis en cada caso. Los valores medios de proliferación de las muestras control se tomaron como 100%. Los resultados son representativos de cuatro experimentos por triplicado. * indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$.

Para comprobar si las dosis estudiadas de Fumonisina B1 inhibían la síntesis de ceramidas (Figura 83), comprobamos mediante HPLC/MS-MS que dichas dosis suprimían la acumulación de ceramidas observadas tras la incubación solo con WIN-55, lo que sugiere que la supresión parcial de la muerte celular provocada por WIN-55 descrita en la figura 83 se debe en parte a la acumulación de ceramidas.

Sin embargo, el tratamiento con FB1 no restauró la capacidad formadora de clones de las células tratadas con WIN-55, sugiriendo que la acumulación de ceramidas, aunque puede proporcionar una ventaja de crecimiento parcial, no parece ser el

mecanismo principal de muerte celular provocado por WIN-55 en las células leucémicas (Figura 84).

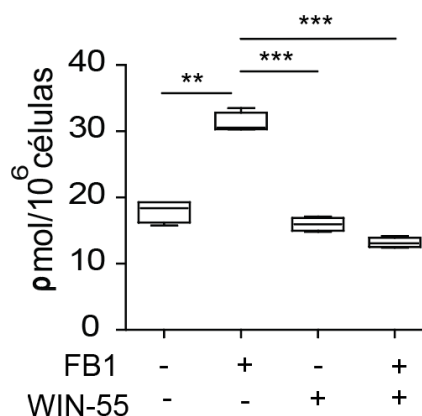


Figura 83. Se incubaron células HL60 con WIN-55 50 μ M en presencia de Fumonisina B1 o vehículo. Después de 6 h, se determinaron los niveles de diferentes tipos de ceramidas mediante HPLC / MS-MS para confirmar la inhibición de ceramidas de FB1. El gráfico muestra como ejemplo los niveles de la ceramida C16:0, aunque todos los otros subtipos disminuyeron sus niveles de igual forma.

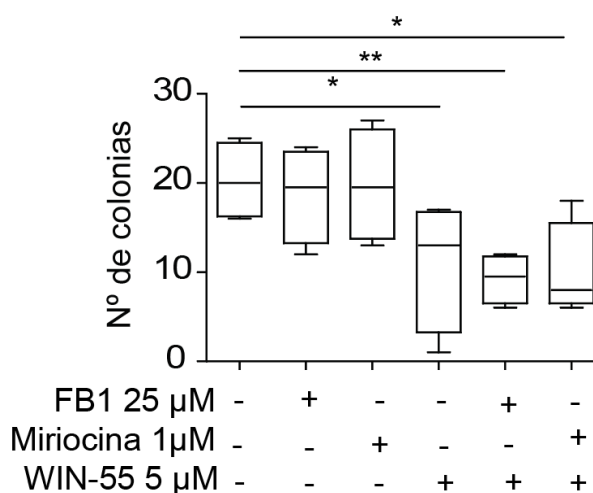


Figura 84. Número de colonias cultivadas a partir de una sola célula tratada con WIN-55 en combinación con vehículo, miriocina o FB1. Solo se indican los casos en los que el estudio estadístico resultó significativo. * indica diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$ y ** un $p \leq 0,005$

5.2.11. WIN-55 altera diversas rutas metabólicas de las células de LMA

Una vez en el interior celular, las moléculas de glucosa sufren un conjunto de reacciones oxidoreductoras que la transforman en dos moléculas de ácido pirúvico. El ácido pirúvico, tras su transformación en acetil-CoA, entra en el ciclo de Krebs para la generación de biomasa celular y la consecuente producción de poder reductor en forma de NADPH y ATP, necesarios para el mantenimiento de la bioenergética celular. El paso de electrones desde el NADPH a la cadena de transporte de electrones se acopla al transporte de protones, que permite la generación de ATP en cantidades necesarias para suplir los procesos celulares adversos.

Además, se ha descrito en la literatura un papel importante de PARP en la regulación de algunas proteínas metabólicas. La hexoquinasa por ejemplo, contiene un motivo susceptible de modificarse mediante PARilación, por lo que la activación de PARP conduce a una disminución de la actividad de HK(Andrabi et al., 2014) y por tanto produce una regulación negativa de la glucólisis (Fouquerel, Goellner, Yu, Gagné, Moura, et al., 2014).

Por ello, nos propusimos estudiar el efecto que podría tener el canabinoide WIN-55 en el proceso de glucólisis y si existía una relación funcional con PARP. Para dicho propósito, se estudió la glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato después del tratamiento con WIN-55 solo o en combinación con Olaparib.

En el caso de la glucólisis, se hizo un estudio exhaustivo de la actividad de las enzimas implicadas tras el tratamiento con WIN-55 (6 horas) en combinación con Olaparib (1 hora de preincubación antes del tratamiento con WIN-55) (Figura 85).

Expresando la actividad enzimática de las células no tratadas como 100% en cada una de las enzimas estudiadas, representamos en la figura 86 todas aquellas cuya actividad enzimática se vio afectada significativamente tras el tratamiento con 100 μ M

de WIN-55 durante 6 horas, que fueron todas las enzimas glucolíticas excepto la enolasa. En concreto, la HK, PGI, PFK, aldolasa, TPI, GAPDH y PGM disminuyeron su actividad mientras que PGK y PK la aumentaron de manera dramática.

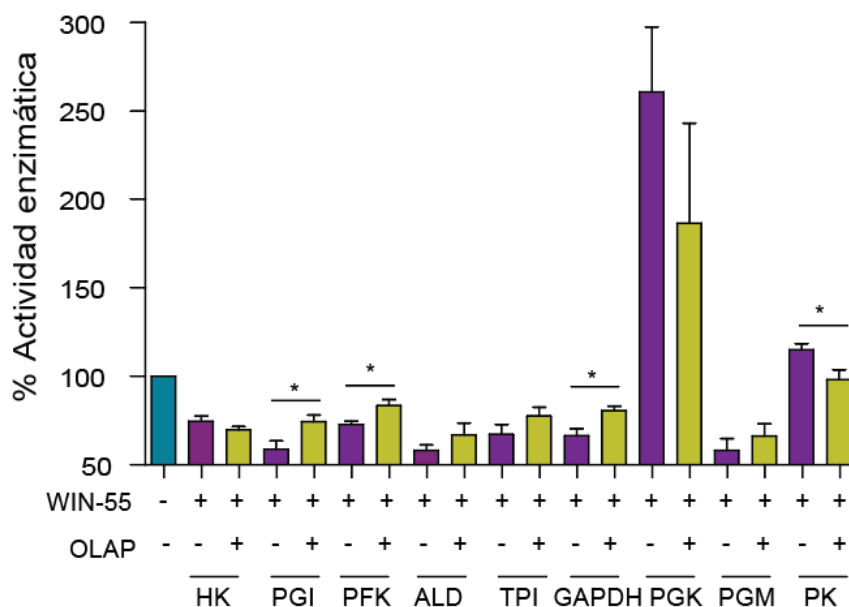


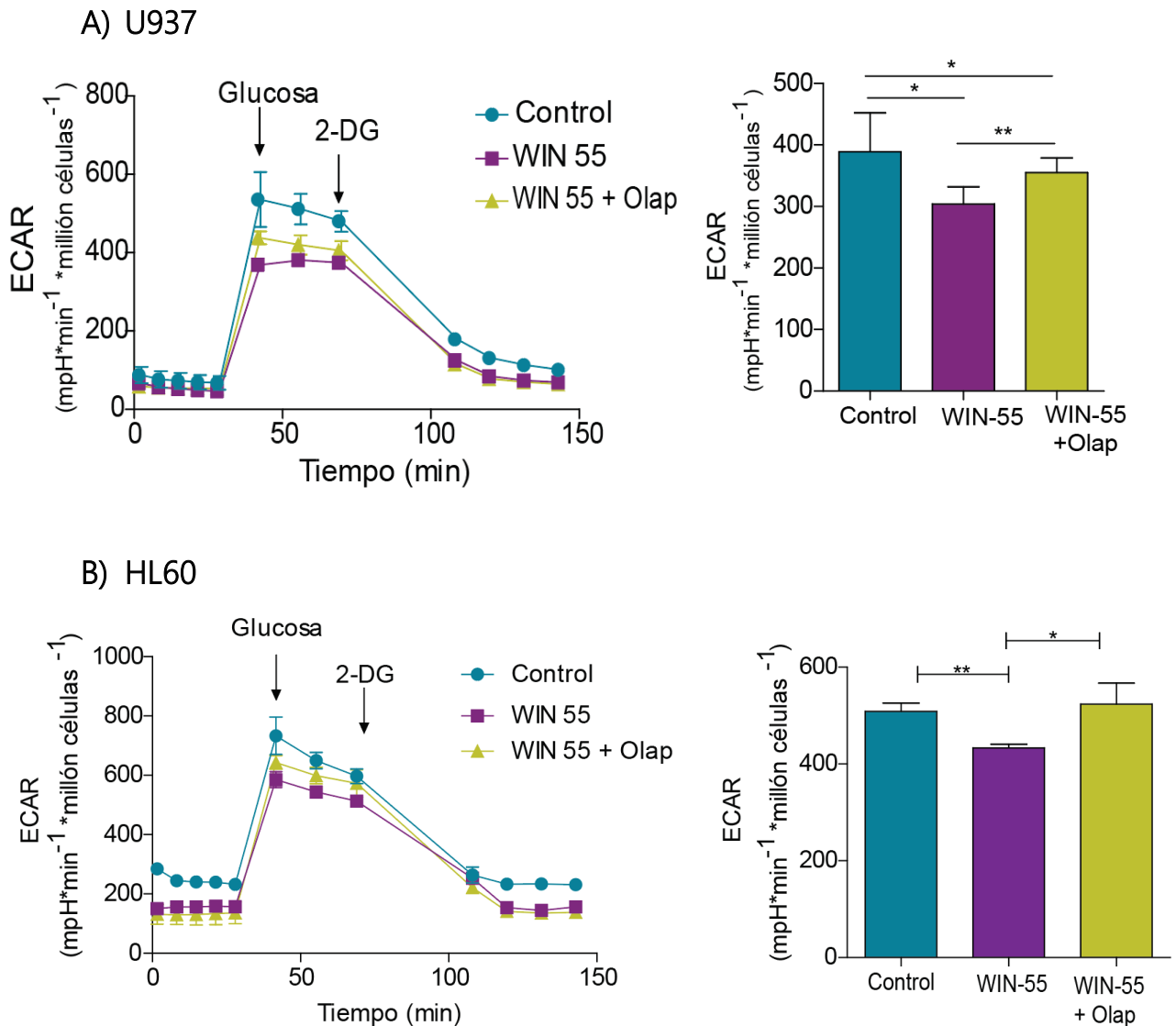
Figura 85. Cuantificación de la actividad de las enzimas glucolíticas mediante el uso de kits específicos para cada una. En la gráfica se muestran todas las enzimas que su actividad se modificó tras el tratamiento durante 6 horas con 100 μ M de WIN-55 de manera significativa con respecto al control. Además, se muestran con asteriscos aquellos casos en los que este aumento o disminución de la actividad provocada por el cannabinoide se revirtió tras la preincubación con Olaparib.

Además, se estudió si la preincubación con Olaparib (10 μ M durante una hora) podría revertir los cambios producidos por WIN-55 en la actividad de las enzimas implicadas en la glucólisis y observamos que Olaparib revertía de manera significativa los cambios en la actividad enzimática provocados por WIN-55 de PGI, PFK, GAPDH y PK.

Para complementar los perfiles metabólicos, se determinó el total de protones producidos en el ciclo de Krebs y excretados por las células atribuible principalmente al

ácido láctico producido en la glucólisis y a la hidratación del CO_2 mediada por la anhidrasa carbónica ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) mediante el análisis de ECAR, utilizando el kit de tasa glucolítica y el analizador de flujo extracelular XFP tras los diferentes tratamientos.

Las células U937 y HL60 tratadas con WIN-55 mostraron menos niveles de ECAR que el grupo control o las células tratadas con WIN-55 + Olaparib, mientras que los niveles de ECAR de las células CD34^+ no se vieron afectados (en este caso no se estudió la combinación de WIN-55 + Olaparib debido a la limitación de células sorteadas disponibles) (Figura 86).



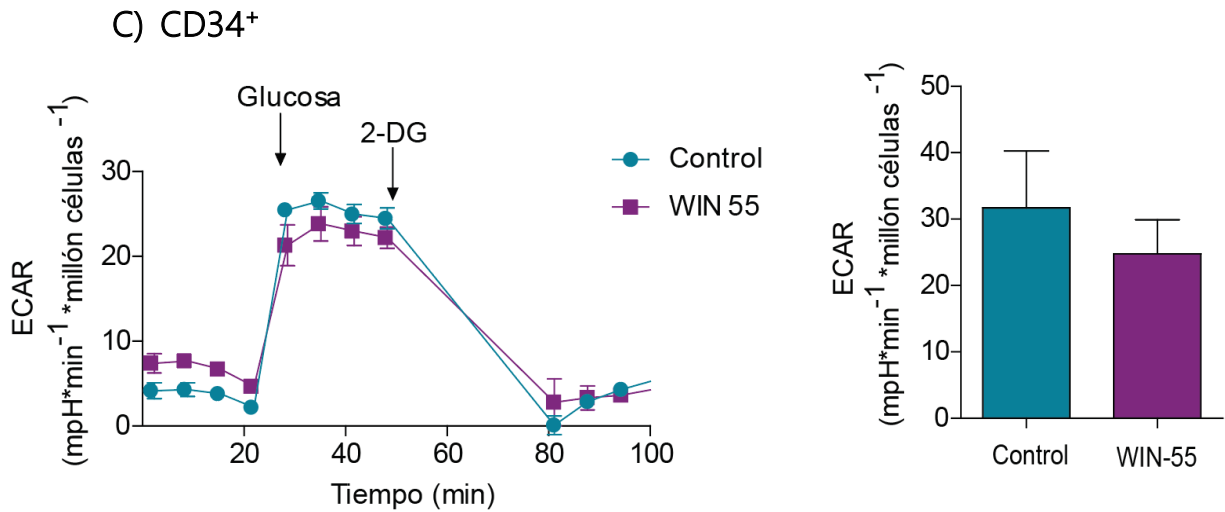


Figura 86. Estudio de la glucólisis en la línea celular A) U937, B) HL60 y C) CD34⁺ sanas usando el kit de tasa glucolítica mediante el analizador de flujo extracelular XFp tras los diferentes tratamientos.

Con estos datos podemos concluir que el tratamiento con WIN-55 afecta a la glucólisis de las líneas de LMA estudiadas, siendo la línea U937 más glucolítica que la HL60, mientras que no se afecta a las células CD34⁺ sanas. Además, la pre-incubación con Olaparib revirtió los cambios producidos por el cannabinoide, sugiriendo que PARP1 juega un papel importante en la modulación de la glucólisis mediada por WIN-55.

Por otro lado, la vía de las pentosas fosfatos se conecta con la glucólisis, siendo la G6Pdh la enzima limitante de este proceso. Por ello, analizamos la actividad de la G6Pdh usando un kit de actividad específico para esta enzima y detectamos una gran disminución en la actividad después de la exposición a WIN-55 en líneas de LMA, que fue revertida por la preincubación de Olaparib (Figura 87).

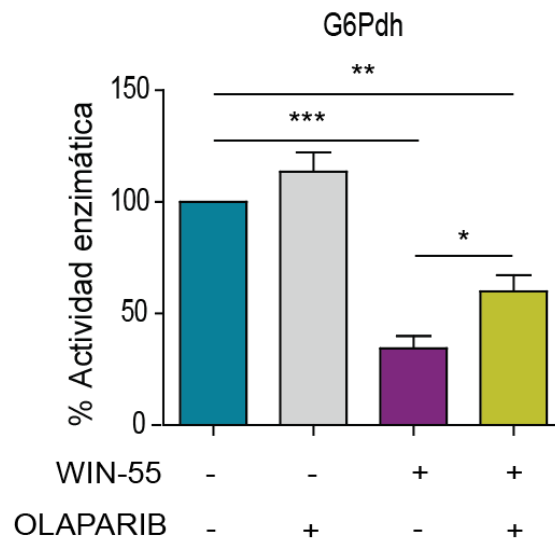


Figura 87. Estudio de la actividad enzimática de G6Pdh usando un kit específico para ello tras el tratamiento durante 6 horas con 100 μ M de WIN-55, 10 μ M de Olaparib o la combinación de ambos.

De todos los resultados anteriores, hay que resaltar a las enzimas GAPDH, PK y G6Pdh, las cuales se afectaban con WIN-55 solo y no cuando se preincubaba las células con Olaparib. GAPDH y PK tienen en común que son las únicas enzimas de glucólisis que usan o generan NAD⁺ y NADH. Además, G6Pdh se caracteriza por generar grandes cantidades de NADPH a partir de NADP.

Para comprobar si existía una depleción de los niveles de NAD⁺ celular, también comprobamos si la coincubación de nicotinamida (NAM), un precursor fisiológico del NAD⁺, solo o en combinación con WIN-55 prevenía la muerte celular provocada por el cannabinoide (Figura 88). La viabilidad celular fue mayor cuando co-incubamos células U937 tratadas con NAM + WIN-55 frente a WIN-55.

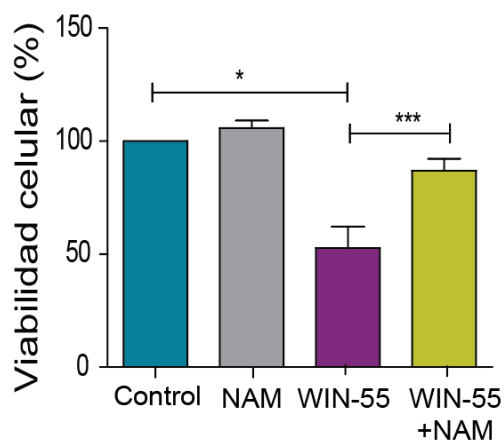


Figura 88. Viabilidad celular medida por Cell Cunting Kit-8 tras la incubación de nicotinamida (NAM) sola o en combinación con WIN-55 durante 18 horas.

Por último, quisimos evaluar el efecto que ejercía WIN-55 en el ciclo de Krebs. Para ello, suplementamos el medio de cultivo con diferentes metabolitos del ciclo de Krebs, como el piruvato (metilpiruvato 5mM), 5 mM de ácido oxalacetato (OAA, 5mM) y succinato (dimetil-succinato 5mM) 24 horas antes de tratar las células con vehículo o WIN-55. Tras el tratamiento, no observamos supresión de la letalidad celular provocada por el tratamiento con WIN-55 mediante análisis de citometría de flujo en la línea celular U937 (Figura 89) ni en la HL60 (datos no mostrados), lo que sugiere que el tratamiento de WIN-55 no bloquea el ciclo de Krebs, ni disminuye la disponibilidad de algunos de sus metabolitos.

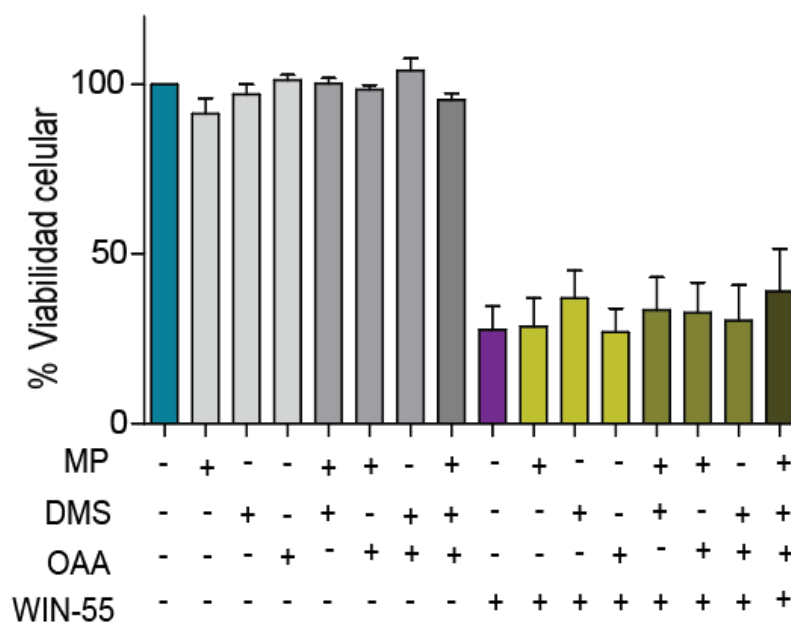


Figura 89. Estudios de viabilidad tras el suplemento de los metabolitos del ciclo de Krebs metil piruvato (MP), dimetil succinato (DMS) y ácido oxalacetato (OAA), todos ellos a una concentración de 5 mM, solos o en combinación con 10 μ M de WIN-55 o vehículo en la línea celular U937 analizados mediante marcaje con 7AAD/Anexina por citometria de flujo.

5.2.12. WIN-55 promueve la muerte celular a través de PARP (Parthanatos).

La muerte celular dependiente de PARP1, Parthanatos, se caracteriza por una pérdida del potencial de membrana mitocondrial irreversible, depleción de NAD^+ celular, fragmentación del ADN y condensación del núcleo, aumento de PAR, parilación de AIF y translocación de AIF de la mitocondria al núcleo.

Como hemos podido constatar en experimentos anteriores, observamos que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial se detectaba a tiempos muy precoces tras la incubación con WIN-55 y que se observaba una depleción de NAD^+ en las células de LMA.

Para comprobar si el tratamiento con WIN-55 producía traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo, estudiamos la localización subcelular de AIF mediante Western blot. Tras la exposición a WIN-55 (50 μ M durante 6 horas) la expresión de AIF disminuía

en la mitocondria mientras aumentaba en la fracción citoplasmática y nuclear (Figura 90).

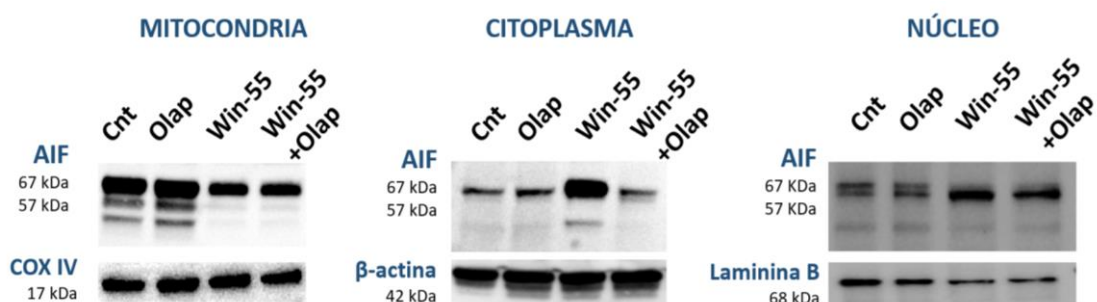


Figura 90. Expresión de AIF tras la incubación con 10 μ M de Olaparib, 50 μ M de WIN-55 o ambos tras 6 horas de incubación en las diferentes fracciones subcelulares obtenido por Western blot. Como control de carga se usaron las proteínas específicas de cada fracción celular COX IV, β -actina y Laminina B respectivamente.

Con estos datos podemos concluir que WIN-55 produce muerte dependiente de PARP1 además de la apoptosis y por ello tanto el inhibidor de pancaspasas como Olaparib, el inhibidor de PARP, fueron capaces de revertir la muerte celular producida por WIN-55 al completo, mientras que el resto de mecanismos estudiados también se veían afectados pero no pudimos demostrar que fueran el desencadenante primario del proceso de muerte, ya que al revertirlo no se recuperó la viabilidad celular de las células leucémicas tratadas con el cannabinoide WIN-55.

DISCUSIÓN

Bloque I. Efecto del cannabinoide WIN-55 en mieloma múltiple

Dentro del campo de la oncología, la investigación con derivados cannabinoides se ha centrado en su efecto antiemético, mientras que sus propiedades antineoplásicas no se abordaron hasta finales de la década de 1990, y se enfocaron en tumores sólidos como el glioma(Sánchez et al., 1998) y el cáncer de mama(De Petrocellis et al., 1998). En cambio, respecto a las neoplasias hematológicas, se dispone de poca información.

Los efectos biológicos de los cannabinoides se han relacionado con varios receptores específicos. De todos ellos, CB1 y CB2 son los que mejor se han caracterizado (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993b). CB1 se expresa abundantemente en el sistema nervioso y está asociado con efectos psicotrópicos mientras que CB2, por el contrario, se expresa principalmente en células hematopoyéticas(Galiegue et al., 1995; Howlett, 2002; Lee et al., 2001).

Respecto a estos últimos, los cannabinoides desempeñan procesos fisiológicos fundamentales como la migración y diferenciación de las células hematopoyéticas(Patinkin et al., 2008), la activación plaquetaria(De Angelis et al., 2014) o la proliferación(Yeshurun et al., 2015). Específicamente, el sistema endocannabinoide regula la hematopoyesis y la migración de las HSC mediante la sinergia con el factor estimulante de colonias, la interleucina-3 (IL-3) y la eritropoyetina a través del receptor CB2(Jordà et al., 2009; Patinkin et al., 2008; P. Valk et al., 1997).

Las células CD34⁺ normales apenas expresan los receptores CB2, lo que las haría menos susceptibles a los efectos de los cannabinoides(M. Victoria Barbado et al., 2017; Jordà et al., 2004). Por otro lado, el marcaje de las células normales de la médula ósea utilizando anticuerpos específicos contra CB2 en combinación con anticuerpos frente a

CD34, CD33, CD66 o CD14 no ha revelado niveles de CB2 detectables en las células mieloides en cualquier etapa de diferenciación(Jordà et al., 2004).

En cuanto a la contrapartida tumoral de las células hematopoyéticas, se han descrito niveles variables de expresión de receptores cannabinoides en linfoma de células del manto(Flygare et al., 2005), leucemia linfocítica crónica(Freund et al., 2016), leucemia linfoblástica aguda(Kampa-Schittenhelm et al., 2016) y ahora, tras estos estudios, en mieloma múltiple(M. Victoria Barbado et al., 2017; Garofano & Schmidt-Wolf, 2020).

Con esta información, podemos considerar que la presencia de receptores CB2 en el tejido hematopoyético abre una oportunidad al uso de derivados cannabinoides en el tratamiento de algunas hemopatías malignas como el mieloma múltiple y la leucemia mieloblástica aguda.

A pesar de la existencia de modelos murinos deficientes tanto en CB1, CB2 o en ambos, hasta la fecha no se descrito que la deficiencia en dichos receptores altere la hematopoyesis o modifique la incidencia de tumores hematopoyéticos en dichos modelos.

Además de la implicación del receptor CB2, Morelli et al. analizaron el efecto del cannabidiol en dos líneas celulares de MM que sobreexpresan el receptor transitorio potencial vanilloide tipo-2 (TRPV2) y en células primarias seleccionadas en base a la expresión de TRPV2(Morelli et al., 2014). Los autores describieron que el cannabidiol ejerce un efecto proapoptótico al menos parcialmente mediado por este receptor. En nuestro caso, dado que las líneas celulares U266 y RPMI no expresan el receptor TRPV2, no encontramos que el efecto de WIN-55 en células mielomatosas esté mediado por este receptor vanilloide. Por su parte, Feng et al. estudiaron el efecto de un antagonista

cannabinoide, la fenilacetilamida, y demostraron que este fármaco induce el bloqueo del ciclo celular en líneas de MM(Feng et al., 2015).

En el presente trabajo de tesis doctoral, demostramos que el cannabinoide sintético WIN-55 reduce la viabilidad de las células de MM, tanto en líneas celulares como células plasmáticas mielomatosas primarias de pacientes con MM de alto riesgo y que, además, este efecto es selectivo, ya que la viabilidad de células sanas normales, incluidas las células madre hematopoyéticas, apenas se vió afectada.

Este efecto proapoptótico es, al menos parcialmente, dependiente de caspasas, presentando la caspasa-2 un papel predominante en el proceso de apoptosis inducida por el cannabinoide WIN-55 en células de MM. La activación de caspasa-2 aguas arriba de la caspasa-9 se ha descrito en células de MM después del tratamiento con bortezomib, un agente que ejerce su efecto proapoptótico a través de un aumento del estrés asociado al RE(Gu et al., 2008). Por otro lado, se ha descrito un efecto similar en líneas celulares de glioma tratadas con cannabinoides(Carracedo, Lorente, et al., 2006).

Inesperadamente, nuestros resultados mostraron que los cannabinoides inhiben la UPR y la expresión de proteínas implicadas en la respuesta al estrés del RE. Este hecho podría indicar que este tratamiento pueden disminuir la capacidad de compensar el estrés del RE basal de las células de MM, lo que afectaría su capacidad para utilizar el papel citoprotector de la UPR(Yadav et al., 2014).

En concreto, la síntesis de novo de ceramida se produce en el RE (Stiban et al., 2008) y juega un papel fundamental en la apoptosis. (Morad & Cabot, 2013; Hannun 1997).

Los cannabinoides pueden promover la síntesis de ceramidas, tanto por hidrólisis de esfingomiélinas como por la vía *de novo*. Pero solo la síntesis por la vía *de novo* se ha

relacionado con el efecto pro-apoptótico de los cannabinoides. La actividad de esta vía está regulada por la enzima SPT(Velasco et al., 2005) y en nuestro caso, descubrimos que la exposición de las líneas celulares de MM a WIN-55 regula la expresión de SPT, aumentando los niveles de ceramidas. De hecho, el bloqueo de la síntesis de ceramida mediante el uso de inhibidores comerciales confirmó la participación de las ceramidas en la apoptosis inducida por los cannabinoides de acuerdo a lo que estaba previamente descrito en glioma(M. Guzmán et al., 2001; Herrera et al., 2006).

Además, las células de MM tratadas con WIN-55 presentaban una pérdida del potencial de membrana mitocondrial temprana, a tiempos más tempranos de los que se detecta la escisión de las caspasas. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito que la ceramida puede pasar del RE a la mitocondria, permeabilizando rápidamente su membrana, incluso antes e independientemente de la activación de las caspasas(Robertson et al., 2004; Colombini, 2013).

También observamos una regulación positiva temprana de Bax y Bak, que están implicados en la estabilización de los canales de ceramida en las mitocondrias(Beverly et al., 2013; Kuwana et al., 2002; Westphal et al., 2014). La ceramida también promueve la inhibición de Mcl-1 y Bcl-xL(Perera et al., 2012), hecho que coincide con la regulación a la baja de ambas proteínas como hemos observado por Western blot.

Por otro lado, podemos destacar que Akt es la vía de señalización activada por WIN-55 de manera más significativa en células de MM, induciendo una respuesta bifásica similar a la inducida por cannabinoides en glioma(Manuel Guzmán, 2003). La inhibición de Akt utilizando otros derivados cannabinoides en melanoma y cáncer de mama ya se ha descrito previamente, y sugiere que el efecto de los cannabinoides

también depende de la inhibición de Akt(Manuel Guzmán, 2003; Velasco et al., 2005, 2012).

Con respecto a las vías de las MAPK y dada la baja magnitud de regulación observada en este estudio, sugerimos que simplemente podría ser una consecuencia de la diafonía entre las vías.

En cuanto al papel de los receptores cannabinoides en el efecto antimieloma, nuestros resultados también sugieren una correlación entre la expresión de CB2 y la susceptibilidad a los cannabinoides, similar a lo descrito en otros tumores(Benito et al., 2008).

Finalmente, en el presente trabajo, aportamos la primera evidencia de un tratamiento *in vivo* exitoso con cannabinoides en un modelo de xenoinjerto murino de MM. Para ello, la línea celular U266, aun siendo la línea celular más resistente *in vitro*, fue seleccionada para realizar los estudios *in vivo*. WIN-55 indujo una inhibición del crecimiento del tumor y no produjo toxicidad manifiesta. De hecho, otros estudios descritos sobre la actividad antiepiléptica de WIN-55 realizados en ratones demostró que, a las mismas dosis utilizadas en nuestro estudio (5 mg/kg), no indujo efectos adversos con respecto a la coordinación motora o el aprendizaje(Florek-Luszczki et al., 2014).

Bloque II. Efecto del cannabinoide WIN-55 en leucemia mieloblástica aguda

Con respecto al linaje mieloide, se sabe que el receptor CB2 está altamente expresado en líneas celulares de LMA así como en blastos primarios de LMA(Jordà et al., 2002, 2004; P. J. M. Valk & Delwel, 1998), lo que contrasta con la baja expresión en HSC normales(M. Victoria Barbado et al., 2017; Jordà et al., 2004).

Es importante destacar que Alberich-Jordà et al. describieron que los derivados cannabinoides podrían inducir un efecto proleucémico(Alberich Jordà et al., 2003; Jordà et al., 2004). En este sentido, los autores describieron que la sobreexpresión de CB2 en precursores mieloides murinos provoca un bloqueo de la diferenciación neutrofílica, una de las principales características de la leucemia mieloide. Estos autores no detectaron receptores CB2 funcionales en HSC murinas normales. Por el contrario, observaron niveles elevados de ARNm de CB2 en muestras de pacientes con LMA(Alberich Jordà et al., 2003; Jordà et al., 2004).

Nuestros datos discrepan con los descritos anteriormente, ya que observamos un potente efecto antileucémico del cannabinoide WIN-55 tanto en líneas celulares leucémicas como en células primarias de pacientes con LMA, efecto que se inhibió parcialmente tras la exposición a antagonistas del receptor CB2.

Además, el efecto proapoptótico de WIN-55 fue selectivo, ya que la viabilidad de las células normales estudiadas, no se vio afectada de manera significativa tras la exposición a los cannabinoides.

Debido a la heterogeneidad existente en los perfiles mutacionales de los pacientes con LMA, quisimos comprobar si existía una correlación entre alguna mutación concreta y la mayor o menor sensibilidad a WIN-55. En este sentido, no encontramos una clara relación entre ambos, aunque sería interesante aumentar el

número de pacientes con algunas mutaciones que mostraban una tendencia, como fue el caso de K-ras, que mostraron una gran resistencia al tratamiento con WIN-55. En relación a este gen, Yang et al. han descrito recientemente que los cannabinoides CBD Y THC suprimen la vía *Kras* activada en células de cáncer pancreático(Y. Yang et al., 2020).

Por otro lado, el efecto antileucémico de WIN-55 en LMA también se confirmó *in vivo*. Para este propósito, tratamos ratones xenoinjertados con la línea celular HL60 con el fármaco una vez que se confirmó la infiltración de la médula ósea mediante citometría de flujo o bioluminiscencia. Esto debe tenerse en cuenta para comprender la supervivencia media tan baja en el grupo control, ya que la supervivencia se evaluó una vez confirmado el injerto de células leucémicas.

En este modelo, el tratamiento con WIN-55 prolongó significativamente la supervivencia en comparación con el grupo control tratado con vehículo y el grupo tratado con ARA-C. Además, más del 20% de los ratones tratados lograron una remisión completa, con ausencia de células HL60 en la médula ósea al final, según se evaluó mediante citometría de flujo.

Aunque existe una reducción inicial en la media de fluorescencia de los animales tratados con WIN-55 respecto a los controles, la pendiente de la curva de regresión lineal indicaría que tras el paso de los días WIN-55 no tiene un claro efecto antiproliferativo en este modelo. Esto se explicaría ya que los individuos con infiltración más aguda del grupo control van muriendo, y por tanto se van excluyendo de la cuantificación, lo que hace que esa diferencia de progresión entre ambos grupos no sea más acusada, a pesar de lo cuál se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En lo que respecta al efecto sobre las células hematopoyéticas normales, en ratones sanos no se observaron efectos significativos sobre la viabilidad de las diferentes subpoblaciones de HSC normales analizadas, destacando únicamente una leve disminución de la población de células LK tras el tratamiento diario durante 28 días, hecho que se correspondió con la población de MEP cuando estudiamos por separado cada una de las subpoblaciones de estos progenitores.

Además, con respecto al recuento de células sanguíneas periféricas, se observó un aumento significativo en el recuento de plaquetas tras la exposición al fármaco.

Una de las características que diferencian las HSC sanas de las células tumorales y las células más maduras es su capacidad de proliferación. Para evaluar si la sensibilidad al efecto proapoptótico de los cannabinoides estaba asociada o no con el ciclo celular, estimulamos las células del ratón *in vivo* con G-CSF y las expusimos a WIN-55. El tratamiento con G-CSF se realizó durante 5 días, y las células se recogieron y estudiaron en ese punto, ya que se ha descrito que es cuando se alcanza el punto máximo de movilización (Winkler et al., 2016).

Aunque en las poblaciones maduras y la mayoría de progenitores hematopoyéticos estudiados no se apreciaron diferencias entre las células estimuladas con G-CSF tratadas o no con WIN-55, en la población de células LKS sí se observó que el efecto de G-CSF sobre la proliferación de las células LT-HSC y ST-HSC se suprime por la adición de WIN-55, bien porque WIN-55 esté actuando sobre la viabilidad de las células más proliferantes o que esté afectando al proceso de diferenciación celular de las HSC.

Curiosamente, en un estudio reciente, Song et al. proponían que el G-CSF podría estar interactuando con el sistema endocannabinoide, más concretamente activando los

receptores CB1 y CB2 tras observar que este fármaco producía efectos celulares y moleculares similares a los que producen los cannabinoides en el tratamiento de lesiones cerebrales traumáticas, si bien este trabajo concluyó que los efectos producidos por el G-CSF son independientes a la activación de los receptores cannabinoides (S. Song et al., 2021).

En cuanto al mecanismo de acción, tras los resultados obtenidos en MM (M. Victoria Barbado et al., 2017), procedimos a comprobar si los mecanismos de acción implicados en la LMA eran los mismos que para el MM.

Tras el estudio transcriptómico realizado mediante arrays de expresión en células tratadas con vehículo frente a las tratadas con WIN-55 obtuvimos diferencias en genes pertenecientes a vías que agrupamos en tres grupos:

1. Genes que afectan a la proliferación celular, la apoptosis y el daño en el ADN.
2. Genes relacionados con el correcto funcionamiento de organelas como el RE y la mitocondria.
3. Genes implicados en vías metabólicas.

Respecto al primer grupo de genes, nos centramos en constatar si las principales vías de señalización que habían resultado afectadas en MM también lo estaban en LMA y pudimos observar que la vía PI3K/AKT, MAPK y la activación de caspasas se afectaban al igual que se había descrito en otras patologías.

Por otro lado, los estudios realizados para comprobar si WIN-55 podría provocar daño al ADN mediante estudios de detección de p-H2AX y PAR no fueron del todo concluyentes. Más aún, la preincubación con Olaparib, inhibidor de PARP, no demostró un efecto sinérgico con WIN-55, lo que descartaría a priori este mecanismo de acción, aunque se deberían realizar estudios más completos para descartar definitivamente esta

hipótesis. De hecho, estudios recientes han descrito que WIN-55 tiene la capacidad de inhibir la proliferación, migración e invasión de células U251 de glioblastoma e inducir la apoptosis al desencadenar daño del ADN dependiente de ROS (K. Wang et al., 2021).

De hecho, los estudios con Olaparib no sólo no demostraron que WIN-55 induce daño en el ADN, sino que, sorprendentemente, el Olaparib revirtió por completo la muerte producida por el cannabinoide, por lo que abrió una nueva vía de investigación en este trabajo, indicando que WIN-55 podría actuar a través de PARP.

Aunque en las muestras analizadas no observamos una fuerte correlación entre la sensibilidad a WIN-55 y los niveles de expresión basales de ARNm de PARP1, está descrito que los blastos procedentes de pacientes con LMA expresan mayores niveles de esta proteína que los progenitores hematopoyéticos sanos, siendo un factor predictivo de baja supervivencia (Li et al., 2018; Pashaiefar et al., 2018).

Cabe mencionar que, en 2015, Faraoni et al. analizaron el efecto de Olaparib como agente único en líneas celulares de LMA y blastos primarios. Las concentraciones que usaron de Olaparib fueron similares a las empleadas en nuestro estudio (0-10 μ M); y estos autores observaron que Olaparib fue capaz de inducir muerte celular en la mayoría de las muestras de casos primarios de leucemia mieloide aguda (88%) y líneas celulares analizadas.

Hay que destacar que la mayoría de las células de LMA primarias analizadas en el estudio de Faraoni et al. se caracterizaron por presentar un nivel bajo de ARNm de BRCA1 y expresión indetectable de esta proteína, que probablemente contribuyó a explicar su alta sensibilidad al Olaparib. Además, observaron que la sobreexpresión de PARP1 se detectó en blastos que no responden a Olaparib, mientras que la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) se asoció con la sensibilidad a fármacos. (Faraoni et al.,

2015). Por tanto, como la inhibición de PARP vía Olaparib genera apoptosis en células de LMA, nos propusimos determinar si WIN-55 genera “un exceso” de actividad de esta proteína, que activaría la vía PARP-thanatos; es decir, las células leucémicas serían sensibles a PARP tanto por exceso como por defecto (Figura 92).

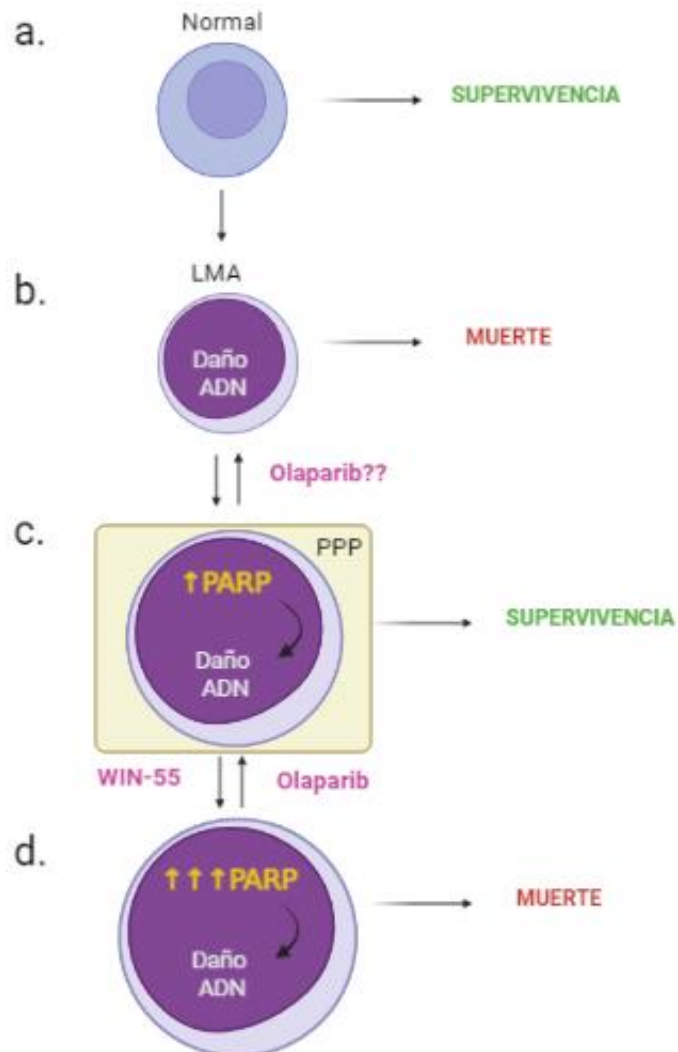


Figura 92. Hipótesis del proceso por el cual WIN-55 actúa en células de LMA. a) En el paso de conversión de HSC sanas normales a b) tumorales se genera daño en el ADN, que en el caso de que la célula no sea capaz de reparar, conducirá a la muerte celular. c) La célula leucémica r sobreexpresa PARP como mecanismo de reparación, lo que le permite sobrevivir a dicho daño. d) Por el contrario, el tratamiento con WIN-55 generaría un exceso de actividad de PARP que provocaría muerte celular vía PARPthanatos en células que ya tienen unos niveles altos de PARP, mientras que este efecto se vería revertido con la adición de Olaparib, al restaurar los niveles de actividad basal de PARP en la célula leucémica.

Por tanto, para que la célula leucémica sobreviva sería necesario un correcto equilibrio de la función de PARP.

En cuanto al segundo grupo de genes afectados en el estudio transcriptómico, aquellos relacionados con el daño en organelas, nos propusimos estudiar más a fondo algunos procesos relacionados con el RE y la mitocondria.

Para el primero, se evaluó la expresión de varias proteínas implicadas en el estrés del RE y la UPR y se observó un aumento significativo de los niveles de p-PERK, p-IRE1 y CHOP después de 6 horas de exposición a WIN-55, que se correspondían con los datos obtenidos en el array y datos ya publicados tras el uso con diferentes cannabinoides en otras patologías(Almada et al., 2020; Carracedo, Lorente, et al., 2006; Lim et al., 2011).

La comunicación bidireccional entre el RE y las mitocondrias regula los procesos fisiológicos en la biología celular, incluido el metabolismo mitocondrial, la muerte celular y el metabolismo de los lípidos(Su et al., 2014).

En este sentido, los estudios realizados en la mitocondria revelaron una reducción significativa en el potencial de membrana mitocondrial y un aumento en los niveles de producción de ROS después de solo 15 min de tratamiento, al igual que observamos en MM(M. Victoria Barbado et al., 2017). Por el contrario, los niveles de ROS permanecieron inalterados en las HSC normales.

Es conocido el papel protector que desempeña PARP en la mitocondria(Hocsak et al., 2017). Además, se ha descrito la presencia de PARP1 en las mitocondrias, probablemente desempeñando un papel en el mantenimiento de la integridad del ADN y el declive energético mitocondrial, ya que la activación de PARP1 afecta a la enzima citocromo oxidasa IV, la tasa de consumo de oxígeno y el potencial de membrana, lo que resulta en un déficit bioenergético en la célula.

Por tanto, comprobamos si la preincubación con Olaparib afectaba la acumulación de ROS producida por WIN-55, sin embargo, no se observaron diferencias significativas, lo que indica que PARP no está actuando a través de daño mitocondrial en respuesta al tratamiento del cannabinoide.

El último grupo de genes altamente afectados en los estudios transcriptómicos fueron aquellos implicados en el metabolismo.

Como hemos visto en el caso del MM, el metabolismo de ceramidas está emergiendo como un segundo mensajero que media los efectos de diversos agentes extracelulares sobre el crecimiento, la diferenciación celular(Okazaki et al., 1990) o la muerte celular programada(Y A Hannun, 1996; Obeid et al., 1993). Al respecto, hay estudios que afirman que las ceramidas son lípidos esenciales que regulan el proceso de apoptosis(Gustafsson et al., 2009; Pettus et al., 2002).

En el estudio actual, encontramos un aumento significativo de los niveles de ceramida de cadena larga (C16:0-C20:1) solo 2 horas después del tratamiento con cannabinoides. Este aumento también fue detectable para las ceramidas de cadena muy larga (C22:0-C24:1) hasta las 6 horas de exposición, aunque luego cayeron a los niveles basales tras tiempos de incubación más largos. Estos resultados concuerdan con estudios previos que describen que los niveles de ceramida C16:0 aumentan en condiciones proapoptóticas y, además, estas ceramidas de cadena larga tienen efectos antiproliferativos y proapoptóticos. Por el contrario, las ceramidas de cadena muy larga como C24:0 y C24:1 promueven la proliferación celular(Grösch et al., 2012).

Además, el pretratamiento con FB1, un inhibidor de la síntesis de novo de ceramidas, previno parcialmente la apoptosis inducida en las células tratadas con WIN-55 mediante ensayos de CCK-8 pero no tras estudios de ensayos de colonias. En

consecuencia, podemos afirmar que la ceramida juega un papel importante en el efecto proapoptótico de los cannabinoides sobre las células leucémicas, pero que no es el mecanismo principal que desencadena la muerte celular.

Curiosamente, se ha descrito que el gen FLT3-ITD, comúnmente mutado o sobreexpresado en pacientes con LMA, suprime la generación de ceramidas lipídicas, induciendo la acumulación de ceramidas en la membrana mitocondrial externa para reclutar autofagosomas para la ejecución de mitofagia (Dany et al., 2016; Hu et al., 2008). Este efecto podría evitar que las células leucémicas entren en apoptosis. Por consiguiente, será interesante evaluar el efecto de los agonistas de CB2 en combinación con inhibidores de FLT3.

Por último, se procedió a estudiar el metabolismo bioenergético, y más en concreto la glucólisis, ya que fue una de las vías con más genes afectados tras el tratamiento con WIN-55.

En la mayoría de las hemopatías malignas existe un equilibrio alterado entre quiescencia y autorrenovación. La LMA es un trastorno clonal que se desarrolla a partir de HSCs que sufren un potencial de expansión y autorrenovación sin restricciones, lo que implica un requerimiento energético celular diferente. El "efecto Warburg" implica una mayor dependencia de las células cancerosas de la glucólisis anaeróbica, incluso en presencia de oxígeno. Aunque esto es cierto para la mayoría de los tipos de tumores, las LSC en la LMA tienen una mayor dependencia de la respiración mitocondrial para su supervivencia. De hecho, las LSC no logran aumentar o utilizar la maquinaria glucolítica cuando se bloquea la energía proveniente de las mitocondrias (Kohli & Passegué, 2014).

Nuestros resultados mostraron una clara afectación de la actividad de todas las enzimas glucolíticas a excepción de la enolasa tras el tratamiento con WIN-55. Además,

la preincubación con Olaparib revirtió este efecto en el caso de la PGI, PFK, GAPDH y PK, lo que indica que podrían ser dianas de PARP. La participación de PARP1 en el control bioenergético fue sugerida ya por Berger et al. en 1985, quien fue el primero que planteó la hipótesis de que la hiperactivación de PARP1 era responsable del agotamiento de NAD⁺/ATP(Berger, 1985).

Estudios más recientes han demostrado un papel clave de PARP1 en el control del metabolismo bioenergético, sustentando un mecanismo común en varias patologías. Se ha visto que las células con PARP1 silenciado presentan una mejora en el fenotipo metabólico celular incluso bajo condiciones de estrés oxidativo. Además, se ha visto que la inhibición de PARP1 es capaz de aliviar el deterioro en el metabolismo bioenergético(Martire et al., 2016)

Diversos trabajos que han descrito previamente el efecto que ejerce PARP1 en enzimas de la glucólisis como HK(Fouquerel, Goellner, Yu, Gagné, de Moura, et al., 2014; H. Song et al., 2016), PFK(H. Song et al., 2016), GAPDH(Du et al., 2003; Giorgi et al., 2017; H. Song et al., 2016), PK(Martire et al., 2016) y enolasa(Giorgi et al., 2017) y PARP14 en PGI (Yanagawa et al., 2007) y PK(lansante et al., 2015). De todas estas enzimas, el efecto que ejerce PARP1 en la modulación de la HK es el más ampliamente conocido, aunque en nuestro caso, Olaparib no revirtió el efecto producido por WIN-55 de forma estadísticamente significativa.

Es importante resaltar que, en la superfamilia de PARP, PARP1 es responsable de >90% de la generación de polímeros de PAR. En condiciones normales, los niveles basales de estos polímeros son muy bajos. Sin embargo, la activación excesiva de PARP1 produce un aumento de la formación de PAR de entre 10 a 500 veces, llegando a

alcanzar los polímeros de PAR longitudes de cientos de unidades de ADP-ribose (D'Amours et al., 1999; Y. Wang et al., 2009).

La poli (ADP-ribose) ación o PARilación es una modificación postraducciona que está involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Hassa, et al., 2006). Este proceso modifica la distribución de la carga de las proteínas pariladas y crea una estructura más voluminosa y compleja que puede resultar en la inhibición de las funciones fisiológicas (Y. Wang et al., 2009).

Cabe destacar también que Olaparib es un inhibidor que afecta a los subtipos PARP1 y PARP2, por lo que la reversión de la caída de la actividad observada tras su preincubación junto a WIN-55 no explicaría que fuese PARP14 la que estuviera actuando en el caso de la PGI.

Por otra parte, los datos obtenidos con las enzimas PFK, GAPDH y PK concuerdan con los datos ya publicados que demuestran la regulación que ejerce PARP1.

La fosfofructoquinasa 1 (PFK1) es una de las enzimas reguladoras más importantes de la vía glucolítica de los mamíferos, llevando a cabo la fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por su parte, es también una de las enzimas reguladoras más importantes en la glucólisis y la gluconeogénesis, ya que cataliza reversiblemente la oxidación y fosforilación de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato. Se ha demostrado que la poli (ADP-ribose) ación inducida por la activación de PARP inhibe PFK1 y GAPDH en células epiteliales del túbulo proximal del riñón (H. Song et al., 2016).

Curiosamente, se ha visto también que, en pacientes con diabetes, la hiperglucemia aumenta los niveles de ROS, que a su vez inducen daño en el ADN y la activación de la poli (ADP-ribose) polimerasa. Este enriquecimiento de la PARilación en

pacientes diabéticos se observó que afectaba particularmente a la GAPDH, lo que provocaba una disminución de su actividad enzimática(Giorgi et al., 2017).

La GAPDH se considera principalmente una proteína glucolítica, localizada en el citoplasma. Sin embargo, está también presente en el núcleo donde está involucrada en la replicación del ADN. Hara et al. han demostrado que, durante la apoptosis, GAPDH sufre una S-nitrosilación mediada por NO. Esta modificación permite la asociación con la proteína Siah, una E3-ubiquitina ligasa, que conduce a una rápida translocación de GAPDH al núcleo. Una vez en el núcleo, PARP1 podría modificar GAPDH y la isoforma PARilada de GAPDH en movimiento entre el núcleo y el citoplasma probablemente puede afectar la vía glucolítica(Hara et al., 2006). La alteración de la vía glucolítica debido a la modificación postraducciona de GAPDH se ha descrito en particular en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC)(Giorgi et al., 2017).

Por otra parte, la piruvato quinasa cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato en el paso de la glucólisis que limita la velocidad de generación de ATP.

La piruvato quinasa tipo 2 (PKM2) se encuentra sobreexpresada en células cancerosas y puede ralentizar la respiración mitocondrial y desviar intermediarios glucolíticos hacia vías biosintéticas como la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno (efecto Warburg). Martire et al. describieron la modulación de la vía glucolítica por PARP1 a través de la PKM2. (Martire et al., 2016). También demostraron que la inhibición de PARP1 hace que el NAD⁺ esté disponible para otras enzimas dependientes de NAD como las sirtuinas. Los inhibidores de PARP1 pudieron reducir el lactato y el ATP producido por la glucólisis, aunque este efecto parecía no ser directo(Martire et al., 2016)

En cuanto a las 2 líneas celulares usadas, observamos que la U937 era más dependiente de la glucólisis que la HL60. Este dato concuerda con los datos obtenidos por Kreitz et al., quienes analizaron varias líneas celulares de LMA y mostraron que la expresión de varios genes glucolíticos y del ciclo de Krebs estaban sobre-expresados en la línea U937 en comparación con la HL-60, donde se observó que la incubación con inhibidores glucolíticos disminuyó de la proliferación celular. Además, la eliminación de la hexoquinasa-1 (HK-1) en las células U937, así como el tratamiento de esta línea celular y de blastos primarios de LMA con el inhibidor de la glucólisis 2-DG aumentó la sensibilidad al agente quimioterapéutico Ara-C (Kreitz et al., 2019).

Por otro lado, nuestros datos indicaron también una importante modulación de la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la cual disminuyó drásticamente tras el tratamiento con WIN-55. La G6Pdh es una enzima limitante de la velocidad de la PPP y, por lo tanto, los niveles de G6Pdh también determinan el flujo de la PPP y la tasa de generación de NADPH (Jain et al., 2004).

En este sentido, se ha descrito que el tratamiento de líneas celulares y células primarias de pacientes con LMA sufren apoptosis tras el tratamiento con 6-aminonicotinamida, un potente inhibidor de la G6Pdh, mientras que las células progenitoras hematopoyéticas normales no se ven afectadas. Además, la inhibición de la vía mTOR, la cual se encuentra altamente activada en la LMA, conduce a una reprogramación metabólica. De hecho, tras la inhibición simultánea de mTOR y G6Pdh, se produce un aumento significativo del metabolismo oxidativo del ciclo de Krebs, junto con la resistencia a los inhibidores de la glucólisis y una reducción de la D-ribosa fosfato, un intermediario de la PPP, en muestras de suero de pacientes con LMA, lo que

sugiere un aumento de la actividad de la PPP y de la síntesis de purinas(Kreitz et al., 2019).

La importancia de la PPP en LMA se ve reforzada por la observación de que los genes de la PPP están regulados al alza en el 61% de los pacientes con LMA analizados en el estudio de Kreitz et al. por lo que, en conjunto, estos resultados implican que la PPP, y especialmente la G6Pdh, pueden considerarse como unas posibles dianas terapéuticas en la LMA(Kreitz et al., 2019).

Por último, confirmamos la presencia de signos característicos de Parthanatos, una muerte celular programada que se caracteriza por la sobreactivación de PARP1, lo que conlleva a la depleción de NAD⁺ y ATP celular, la liberación de AIF desde la mitocondria al núcleo y la PARilación de estos factores.

El factor inductor de apoptosis (AIF) es una flavoproteína mitocondrial que contribuye tanto a la vida como la muerte celular. Bajo condiciones fisiológicas normales, AIF mantiene la estructura mitocondrial y juega un papel esencial en la fosforilación oxidativa. Por el contrario, en condiciones patológicas, AIF es un mediador clave en la muerte celular independiente de caspasas, y más en concreto en la muerte celular dependiente de PARP1 (Y. Wang et al., 2009). El polímero PAR es tóxico para las células. Por lo tanto, la señalización del polímero PAR junto con el aumento de AIF mitocondrial es el evento clave que inicia la diafonía mortal entre el núcleo y las mitocondrias en Parthanatos(Y. Wang et al., 2009).

Aunque el mecanismo por el cual AIF contribuye a la muerte celular no se conoce exactamente, un factor fundamental es su translocación de la mitocondria al núcleo, en el cual induce el paso de la fosfatidilserina a la membrana plasmática externa, se disipe el potencial de membrana mitocondrial, se condense la cromatina y se

produzca la fragmentación del ADN a gran escala (≈ 50 kb) que conduce a la muerte celular (Susin, et al.,1999). Sin embargo, a diferencia de la apoptosis, no causa la formación de cuerpos apoptóticos o fragmentación del ADN a pequeña escala. Además, la muerte celular inducida por PARP1 no puede ser rescatada por inhibidores de pan-caspasa, como z-VAD-fmk. (Yu, et al., 2002).

Como hemos visto en nuestro trabajo, por Western blot se pueden detectar dos bandas AIF. La primera corresponde a un peso molecular de 67 kDa y se trata del precursor que se sintetiza en el citoplasma y se importa a las mitocondrias. Este precursor contiene una secuencia de localización mitocondrial predicha en su extremo N-terminal. Durante su importación a las mitocondrias, AIF es procesada para dar lugar a la forma madura de 62 kDa mediante una escisión en la región Met53/Ala54 (Otera, et al., 2005). Aunque anteriormente se pensaba que la forma madura de AIF era de 57 kDa (Susin, et al., 1999), ahora hay evidencias que indica que el AIF maduro es de 62 kDa (Cao, et al., 2007, Otera, et al., 2005).

Otro de los eventos importantes en Parthanatos como hemos mencionado anteriormente es la depleción del NAD⁺ celular.

Tras su activación, PARP1 transforma el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) en largos polímeros de PAR y los transfiere a una variedad de proteínas nucleares, incluidas las histonas, ADN polimerasas, topoisomerasas, ADN ligasa-2, factores de transcripción y a sí mismo. (Lautier, et al., 1993, Smulson, et al., 2000).

El NAD⁺ es un cofactor de la glucólisis y del ciclo de Krebs, proporcionando ATP a la mayoría de los procesos celulares (Hageman y Stierum, 2001). De este modo, la sobreactivación de PARP1 da como resultado la utilización del NAD⁺ y, por tanto, el agotamiento de los niveles de NAD⁺ y ATP, lo que podría causar la muerte celular, si

bien algunos estudios indican que el agotamiento energético por sí solo podría no ser suficiente para mediar Parthanatos(Y. Wang et al., 2009).

Nuestros datos indican que WIN-55 induce la liberación de AIF desde la mitocondria, observándose mayores niveles tras el tratamiento en la fracción citoplasmática y nuclear. También se observó que cuando se suplementaba a las células con nicotinamida, un precursor del NAD⁺, se recuperaba la viabilidad celular de las células tratadas con WIN-55, lo que sugiere que la célula sufre una depleción del mismo.

Se han realizado experimentos complementarios a los aquí mencionados, como es el estudio de la parilación de AIF por coimmunoprecitación para detectar los residuos de PAR en este factor, al igual que también se hizo con las enzimas glucolíticas GAPDH, G6PDH y PK, pero por problemas metodológicos de especificidad de los anticuerpos comerciales disponibles no pudimos darlos por válidos.

Todos estos datos indican que el cannabinoide WIN-55 podría ser un buen candidato para el tratamiento de pacientes con LMA. Con respecto a esta enfermedad, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas es todavía una necesidad médica insatisfecha(Estey et al., 2006; Löwenberg et al., 2003; Stone et al., 2004; Tallman et al., 2005). A día de hoy se están desarrollando nuevos fármacos contra dianas moleculares que probablemente mejorarán el resultado de estos pacientes, aunque todavía se dispone de datos clínicos limitados(Chakravarti et al., 2014; Han et al., 2013). Así, el presente estudio abre una oportunidad para el uso de una nueva familia de compuestos con efecto antileucémico muy selectivo.

CONCLUSIONES

1. Respecto al efecto del cannabinoide WIN-55 en el tratamiento del MM:
 - a. El cannabinoide WIN-55 induce apoptosis selectiva en las líneas celulares de MM y en las células plasmáticas primarias de pacientes con MM, mientras que no afecta la viabilidad de las células normales de donantes sanos. Este efecto está mediado por la activación de caspasas, siendo la caspasa-2 la más afectada. Este efecto proapoptótico fue parcialmente bloqueado por un inhibidor de la pancaspasas.
 - b. El efecto proapoptótico de WIN-55 se correlacionó con una mayor expresión de Bax y Bak, una disminución de Bcl-xL y Mcl-1, una respuesta bifásica de Akt/PKB y un aumento en los niveles de ceramida en células MM. La inhibición de la síntesis de ceramida previno parcialmente la apoptosis, lo que indica que estos esfingolípidos desempeñan un papel importante en el efecto proapoptótico de los cannabinoides en las células MM.
 - c. El bloqueo del receptor CB2 también inhibió la apoptosis inducida por WIN-55.
 - d. El derivado cannabinoide WIN-55 mejoró la actividad antimieloma de la dexametasona y el melfalán sensibilizando a las células que presentaban resistencia al melfalán *in vitro*.
 - e. Finalmente, la administración del cannabinoide WIN-55 a ratones portadores de plasmocitoma suprimió significativamente el crecimiento tumoral *in vivo*.

2. Respecto al efecto del cannabinoide WIN-55 en el tratamiento de la LMA:
 - a. WIN-55 ejerce un efecto antileucémico potente y selectivo in vitro, ex vivo e in vivo en modelos de ratón sin afectar la hematopoyesis normal.
 - b. El patrón de respuesta a WIN-55 no se correlacionó con el perfil mutacional encontrado en las células de pacientes con LMA.
 - c. El efecto antileucémico de WIN-55 se revirtió parcialmente mediante el uso de antagonistas de CB2 o un inhibidor de pancaspasa, lo que demuestra la participación del receptor CB2 y la activación de caspasas durante el proceso apoptótico.
 - d. Este efecto ocurre después de un daño temprano en las mitocondrias y el RE y está, al menos en parte, mediado por la inducción de la acumulación de ceramida.
 - e. No hemos podido demostrar que el efecto antileucémico de WIN-55 sea dependiente del daño del ADN.
 - f. WIN-55 ejerce un efecto antileucémico selectivo mediante la desregulación de las vías de la glucólisis y las pentosas fosfato, el agotamiento del NAD⁺ celular y la importación nuclear de AIF, que se revierten mediante la incubación con el inhibidor de PARP1 Olaparib.

REFERENCIAS

- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, & IL, W. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774), 193–197.
- Alberich Jordà, M., Löwenberg, B., & Delwel, R. (2003). The peripheral cannabinoid receptor Cb2, a novel oncoprotein, induces a reversible block in neutrophilic differentiation. *Blood*, 101(4), 1336–1343. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2034>
- Alemasova, E. E., & Lavrik, O. I. (2019). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: Reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Research*, 47(8), 3811–3827. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>
- Alferink, J., Specht, S., Arends, H., Schumak, B., Schmidt, K., Ruland, C., Lundt, R., Kemter, A., Dlugos, A., Kuepper, J. M., Poppensieker, K., Findeiss, M., Albayram, N., Otte, D. M., Marazzi, J., Gertsch, J., Förster, I., Maier, W., Scheu, S., ... Zimmer, A. (2016). Cannabinoid receptor 2 modulates susceptibility to experimental cerebral malaria through a CCL17-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19517–19531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.746594>
- Almada, M., Costa, L., Fonseca, B., Alves, P., Braga, J., Gonçalves, D., Teixeira, N., & Correia-Da-Silva, G. (2020). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol promotes endoplasmic reticulum stress in placental cells. *Reproduction*, 160(2), 171–180. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0539>
- Anderson, K. C., & Carrasco, R. D. (2011). Pathogenesis of myeloma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 249–274. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130249>
- Anderson, N. M., Mucka, P., Kern, J. G., & Feng, H. (2018). The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein and Cell*, 9(2), 216–237. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0451-1>
- Andrabi, S. A., No, S. K., Yu, S. W., Wang, H., Koh, D. W., Sasaki, M., Klaus, J. A., Otsuka, T., Zhang, Z., Koehler, R. C., Hurn, P. D., Poirier, G. G., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2006). Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18308–18313. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606526103>
- Andrabi, S. A., Umanah, G. K. E., Chang, C., Stevens, D. A., Karuppagounder, S. S., Gagné, J. P., Poirier, G. G., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10209–10214. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405158111>
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, Wang SA, Bagg A, Barbui T, Branford S, Bueso-Ramos CE, Cortes JE, Dal Cin P,

- DiNardo CD, Dombret H, Duncavage EJ, Ebert BL, Estey EH, Facchetti F, Foucar K, Gangat N, Gianelli U, Godley LA, Gökbuget N, Gotlib J, Hellström-Lindberg E, Hobbs GS, Hoffman R, Jabbour EJ, Kiladjian JJ, Larson RA, Le Beau MM, Loh ML, Löwenberg B, Macintyre E, Malcovati L, Mullighan CG, Niemeyer C, Odenike OM, Ogawa S, Orfao A, Papaemmanuil E, Passamonti F, Porkka K, Pui CH, Radich JP, Reiter A, Rozman M, Rudelius M, Savona MR, Schiffer CA, Schmitt-Graeff A, Shimamura A, Sierra J, Stock WA, Stone RM, Tallman MS, Thiele J, Tien HF, Tzankov A, Vannucchi AM, Vyas P, Wei AH, Weinberg OK, Wierzbowska A, Cazzola M, Döhner H, Tefferi A. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200-1228. doi: 10.1182/blood.2022015850. PMID: 35767897; PMCID: PMC9479031.
- Barbado, M. Victoria, Medrano, M., Caballero-Velázquez, T., Álvarez-Laderas, I., Sánchez-Abarca, L. I., García-Guerrero, E., Martín-Sánchez, J., Rosado, I. V., Piruat, J. I., Gonzalez-Naranjo, P., Campillo, N. E., Páez, J. A., & Pérez-Simón, J. A. (2017). Cannabinoid derivatives exert a potent anti-myeloma activity both in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer*, 140(3), 674–685. <https://doi.org/10.1002/ijc.30483>
- Barbado, M.V., Medrano, M., Caballero-Velázquez, T., Álvarez-Laderas, I., Sánchez-Abarca, L. I., García-Guerrero, E., Martín-Sánchez, J., Rosado, I. V., Piruat, J. I., Gonzalez-Naranjo, P., Campillo, N. E., Páez, J. A., & Pérez-Simón, J. A. (2017). Cannabinoid derivatives exert a potent anti-myeloma activity both in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer*, 140(3). <https://doi.org/10.1002/ijc.30483>
- Barquinero-Máñez, J. (2009). Células Madre Adultas. In *Células madre y terapia regenerativa* (Monografía, pp. 59–81). <https://celulasmadreterapia.com/celulas-madre-adultas/>
- Benito, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Núñez, E., Castillo, A. I., & Romero, J. (2008). Cannabinoid CB 2 receptors in human brain inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 277–285. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707505>
- Berger, N. A. (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation Research*, 101(1), 4–15.
- Beverly, L. J., Howell, L. A., Hernandez-Corbacho, M., Casson, L., Chipuk, J. E., & Siskind, L. J. (2013). BAK activation is necessary and sufficient to drive ceramide synthase-dependent ceramide accumulation following inhibition of BCL2-like proteins. *Biochemical Journal*, 452(1), 111–119. <https://doi.org/10.1042/BJ20130147>
- Bifulco, M., & Di Marzo, V. (2002). Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: A call for further research. *Nature Medicine*, 8(6), 547–550. <https://doi.org/10.1038/nm0602-547>

- Bochum, S., Berger, S., & Martens, U. M. (2018). Olaparib. *Recent Results in Cancer Research*, 211, 217–233. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_15
- Bonnet, D. (2002). Haematopoietic stem cells. *Journal of Pathology*, 4(1), 430–440. <https://doi.org/10.1186/gb-spotlight-20030122-01>
- Bouaboula, M., Rinaldi, M., Carayon, P., Carillon, C., Delpech, B., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1993). Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *European Journal of Biochemistry*, 214(1), 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17910.x>
- Bruns, I., Cadeddu, R. P., Brueckmann, I., Fröbel, J., Geyh, S., Büst, S., Fischer, J. C., Roels, F., Wilk, C. M., Schildberg, F. A., Hünerlitürkoglu, A. N., Zilkens, C., Jäger, M., Steidl, U., Zohren, F., Fenk, R., Kobbe, G., Brors, B., Czibere, A., ... Haas, R. (2012). Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34 + hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 120(13), 2620–2630. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347484>
- Büchner, T., Berdel, W. E., Haferlach, C., Haferlach, T., Schnittger, S., Müller-Tidow, C., Braess, J., Spiekermann, K., Kienast, J., Staib, P., Grüneisen, A., Kern, W., Reichle, A., Maschmeyer, G., Aul, C., Lengfelder, E., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Wörmann, B., & Hiddemann, W. (2009). Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: A study by the german acute myeloid leukemia cooperative group. *Journal of Clinical Oncology*, 27(1), 61–69. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4245>
- Caffarel, M. M., Andradas, C., Mira, E., Pérez-Gómez, E., Cerutti, C., Moreno-Bueno, G., Flores, J. M., García-Real, I., Palacios, J., Mañes, S., Guzmán, M., & Sánchez, C. (2010). Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Molecular Cancer*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-196>
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., & Iovanna, J. L. (2006). Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Research*, 66(13), 6748–6755. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0169>
- Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., Blázquez, C., García, S., Giroux, V., Malicet, C., Villuendas, R., Gironella, M., González-Feria, L., Piris, M. Á., Iovanna, J. L., Guzmán, M., & Velasco, G. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, 9(4), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.005>
- Carter, J. L., Hege, K., Kalpage, H. A., Edwards, H., Hüttemann, M., Taub, J. W., & Ge, Y. (2020). Targeting mitochondrial respiration for the treatment of acute myeloid leukemia. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114253. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114253>

- Casanova, M. (2003). Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *Journal of Clinical ...*, 111(1), 43–50. <https://doi.org/10.1172/JCI200316116>. Introduction
- Chakravarti, B., Ravi, J., & Ganju, R. K. (2014). Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget*, 5(15), 5852–5872. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2233>
- Challen, G. A., Boles, N., Lin, K. K. Y., & Goodell, M. A. (2009). Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry Part A*, 75(1), 14–24. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20674>
- Chapuis, N., Poulain, L., Birsén, R., Tamburini, J., & Bouscary, D. (2019). Rationale for targeting deregulated metabolic pathways as a therapeutic strategy in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00405>
- Chen, J., Odenike, O., & Rowley, J. D. (2010). Leukaemogenesis: More than mutant genes. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/nrc2765>
- Chen, Y., Xu, Q., Ji, D., Wei, Y., Chen, H., Li, T., Wan, B., Yuan, L., Huang, R., & Chen, G. (2016). Inhibition of pentose phosphate pathway suppresses acute myelogenous leukemia. *Tumor Biology*, 37(5), 6027–6034. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4428-5>
- Cheng, H., Zheng, Z., & Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein and Cell*, 11(1), 34–44. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Colombini, M. (2013). Membrane Channels Formed by Ceramide. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 109–126. doi:10.1007/978-3-7091-1368-4_6
- Console-Bram, L., Brailoiu, E., Brailoiu, G. C., Sharir, H., & Abood, M. E. (2014). Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: A tale of biased agonism. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3908–3917. <https://doi.org/10.1111/bph.12746>
- Crowther, D., Bateman, C. J. T., Vartan, C. P., Whitehouse, J. M. A., Malpas, J. S., Fairley, G. H., & Scott, R. B. (1970). Combination chemotherapy using l-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *British Medical Journal*, 4(5734), 513–517. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5734.513>
- Cseh, A. M., Fábíán, Z., Sümegi, B., & Scorrano, L. (2017). Poly(adenosine

- diphosphate-ribose) polymerase as therapeutic target: Lessons learned from its inhibitors. *Oncotarget*, 8(30), 50221–50239. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16859>
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., & Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, 342(2), 249–268. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3420249>
- Danner, E., Hoffmann, F., Lee, S. Y., Cordes, F., Orban, S., Dauber, K., Chudziak, D., Spohn, G., Wiercinska, E., Tast, B., Karpova, D., & Bonig, H. (2019). Modest and nonessential roles of the endocannabinoid system in immature hematopoiesis of mice. *Experimental Hematology*, 78, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2019.09.022>
- Dany, M., Gencer, S., Nganga, R., Thomas, R. J., Oleinik, N., Baron, K. D., Szulc, Z. M., Ruvalo, P., Kornblau, S., Andreeff, M., & Ogretmen, B. (2016). Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. *Blood*, 128(15), 1944–1958. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-708750>
- De Angelis, V., Koekman, A. C., Weeterings, C., Roest, M., De Groot, P. G., Herczenik, E., & Maas, C. (2014). Endocannabinoids control platelet activation and limit aggregate formation under flow. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108282>
- De Petrocellis, L., Melck, D., Palmisano, A., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., & Di Marzo, V. (1998). The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8375–8380. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8375>
- Derocq, J. M., Jbilo, O., Bouaboula, M., Ségui, M., Clère, C., & Casellas, P. (2000). Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 15621–15628. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.15621>
- Di Marzo, V. (1999). Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: Relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sciences*, 65(6–7), 645–655. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00287-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00287-8)
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: Endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences*, 21(12), 521–528. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01283-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01283-1)
- Dillman, R. O., Davis, R. B., Green, M. R., Weiss, R. B., Gottlieb, A. J., Caplan, S., Kopel, S., Preisler, H., McIntyre, O. R., & Schiffer, C. (1991). A comparative

- study of two different doses of cytarabine for acute myeloid leukemia: A phase III trial of cancer and leukemia group B. *Blood*, 78(10), 2520–2526. <https://doi.org/10.1182/blood.v78.10.2520.2520>
- DiNardo, C. D., & Wei, A. H. (2020). How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs. *Blood*, 135(2), 85–96. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001239>
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Löwenberg, B., & Bloomfield, C. D. (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), 453–474. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>
- Döhner, H., Estey, E. H. E., Amadori, S., Appelbaum, F. R. F. R., Büchner, T., Burnett, A. K. a. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. a. R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Löwenberg, B., Bloomfield, C. D., & Others. (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), 453–474. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>.
- Du, X., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengellér, Z., Szabó, C., & Brownlee, M. (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 112(7), 1049–1057. <https://doi.org/10.1172/JCI18127>
- Espaillet, M. P., Shamseddine, A. A., Adada, M. M., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2015). Ceramide and sphingosine-1-phosphate in cancer, two faces of the sphinx. *Translational Cancer Research*, 4(5), 484–499. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.10.01>
- Estey, E., Döhner, H., & Dohner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368(9550), 1894–1907. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69780-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69780-8)
- Faraoni, I., Compagnone, M., Lavorgna, S., Angelini, D. F., Cencioni, M. T., Piras, E., Panetta, P., Ottone, T., Dolci, S., Venditti, A., Graziani, G., & Lo-Coco, F. (2015). BRCA1, PARP1 and γ H2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(3), 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.001>
- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2000–2016. <https://doi.org/10.1111/bph.12416>

- Feng, R., Tong, Q., Xie, Z., Cheng, H., Wang, L., Lentzsch, S., Roodman, G. D., & Xie, X. Q. (2015). Targeting cannabinoid receptor-2 pathway by phenylacetamide suppresses the proliferation of human myeloma cells through mitotic dysregulation and cytoskeleton disruption. *Molecular Carcinogenesis*, *54*(12), 1796–1806. <https://doi.org/10.1002/mc.22251>
- Florek-Luszczki, M., Zagaja, M., & Luszczki, J. J. (2014). Influence of WIN 55,212-2 on the anticonvulsant and acute neurotoxic potential of clobazam and lacosamide in the maximal electroshock-induced seizure model and chimney test in mice. *Epilepsy Research*, *108*(10), 1728–1733. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.10.004>
- Flygare, J., Gustafsson, K., Kimby, E., Christensson, B., & Sander, B. (2005). Cannabinoid receptor ligands mediate growth inhibition and cell death in mantle cell lymphoma. *FEBS Letters*, *579*(30), 6885–6889. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.020>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. . (1987). *a Simple*. *55*(5), 999–1033.
- Fonseca, B. M., Costa, M. A., Almada, M., Correia-Da-Silva, G., & Teixeira, N. A. (2013). Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *102–103*(228), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.02.002>
- Fouquerel, E., Goellner, E. M., Yu, Z., Gagné, J., Moura, M. B. De, Feinstein, T., Wheeler, D., Redpath, P., Li, J., Romero, G., Migaud, M., Houten, B. Van, Poirier, G. G., & Robert, W. (2014). ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD⁺ depletion. *Cell Rep.*, *8*(6), 1819–1831. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.036>.ARTD1/PARP1
- Fouquerel, E., Goellner, E. M., Yu, Z., Gagné, J. P., de Moura, M. B., Feinstein, T., Wheeler, D., Redpath, P., Li, J., Romero, G., Migaud, M., Van Houten, B., Poirier, G. G., & Sobol, R. W. (2014). ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD⁺ depletion. *Cell Reports*, *8*(6), 1819–1831. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.036>
- Freund, P., Porpaczy, E. A., Le, T., Gruber, M., Pausz, C., Staber, P., Jäger, U., & Vanura, K. (2016). Cannabinoid receptors are overexpressed in CLL but of limited potential for therapeutic exploitation. *PLoS ONE*, *11*(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156693>
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V. H. J., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J. M., Cavé, H., Pane, F., Aerts, J. L. E., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., González, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G., & van Dongen, J. J. M. (2003). Standardization and quality control studies of “real time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe

- Against Cancer Program. *Leukemia*, 17(12), 2318–2357. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403135>
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>
- Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M. L., Del Pulgar, T. G., Izquierdo, M., & Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine*, 6(3), 313–319. <https://doi.org/10.1038/73171>
- García-sanz, R., Victoria, M., Fernando, J., & Miguel, S. (2007). *Mieloma múltiple*. 129(3), 104–115.
- Garofano, F., & Schmidt-Wolf, I. G. H. (2020). High expression of cannabinoid receptor 2 on cytokine-induced killer cells and multiple myeloma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms21113800>
- Gibson, B. A., & Kraus, W. L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), 411–424. <https://doi.org/10.1038/nrm3376>
- Gilbert, C., Rollet-Labelle, E., Caon, A. C., & Naccache, P. H. (2002). Immunoblotting and sequential lysis protocols for the analysis of tyrosine phosphorylation-dependent signaling. *Journal of Immunological Methods*, 271(1–2), 185–201. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00347-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00347-2)
- Giorgi, A., Tempera, I., Napoletani, G., Drovandi, D., Potestà, C., Martire, S., Mandosi, E., Filardi, T., Eugenia Schininà, M., Morano, S., d’Erme, M., & Maras, B. (2017). Poly(ADP-ribosylated) proteins in mononuclear cells from patients with type 2 diabetes identified by proteomic studies. *Acta Diabetologica*, 54(9), 833–842. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1013-y>
- Gómez Del Pulgar, T., Velasco, G., & Guzmán, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochemical Journal*, 347(2), 369–373. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470369>
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., & Guzmán, M. (2002). De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *The Biochemical Journal*, 363(Pt 1), 183–188. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630183>
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12. doi: 10.1126/science.281.5381.1309. PMID: 9721092

- Grösch, S., Schiffmann, S., & Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>
- Grullich, C., Sullards, M. C., Fuks, Z., Merrill, A. H., & Kolesnick, R. (2000). CD95(Fas/APO-1) signals ceramide generation independent of the effector stage of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8650–8656. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8650>
- Gu, H., Chen, X., Gao, G., & Dong, H. (2008). Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2298–2307. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0186>
- Gustafsson, K., Sander, B., Bielawski, J., Hannun, Y. A., & Flygare, J. (2009). Potentiation of Cannabinoid-Induced Cytotoxicity in Mantle Cell Lymphoma through Modulation of Ceramide Metabolism. *Molecular Cancer Research*, 7(7), 1086–1098. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0361>
- Guzmán, M., Galve-Roperh, I., & Sánchez, C. (2001). Ceramide: A new second messenger of cannabinoid action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(1), 19–22. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01586-8](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01586-8)
- Guzmán, Manuel. (2003). Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrc1188>
- Han, S., Thatte, J., Buzard, D. J., & Jones, R. M. (2013). Therapeutic utility of cannabinoid receptor type 2 (CB2) selective agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(21), 8224–8256. <https://doi.org/10.1021/jm4005626>
- Hannun, Y A. (1996). Function of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 274(5294), 1855–1859.
- Hannun YA. Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids. *Adv Exp Med Biol*. 1997;400A:305-12. doi: 10.1007/978-1-4615-5325-0_43. PMID: 9547572.
- Hannun, Yusuf A., & Obeid, L. M. (2011). Many ceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 27855–27862. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.254359>
- Hara, M. R., Cascio, M. B., & Sawa, A. (2006). GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(5), 502–509. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.012>
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Sep;70(3):789-829. doi: 10.1128/MMBR.00040-05. PMID: 16959969; PMCID: PMC1594587.
- Heeres, J. T., & Hergenrother, P. J. (2007). Poly(ADP-ribose) makes a date with death.

- Current Opinion in Chemical Biology*, 11(6), 644–653.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.038>
- Heidari, R., Ghanbarinejad, V., Mohammadi, H., Ahmadi, A., Ommati, M. M., Abdoli, N., Aghaei, F., Esfandiari, A., Azarpira, N., & Niknahad, H. (2018). Mitochondria protection as a mechanism underlying the hepatoprotective effects of glycine in cholestatic mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(August 2017), 1086–1095. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.166>
- Hejazi, N., Zhou, C., Oz, M., Sun, H., Jiang, H. Y., & Zhang, L. (2006). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors. *Molecular Pharmacology*, 69(3), 991–997. <https://doi.org/10.1124/mol.105.019174>
- Hernández-Corbacho, M. J., Salama, M. F., Canals, D., Senkal, C. E., & Obeid, L. M. (2017). Sphingolipids in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(1), 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.09.019>
- Herrera, B., Carracedo, A., Diez-Zaera, M., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., & Velasco, G. (2006). The CB2cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway. *Experimental Cell Research*, 312(11), 2121–2131. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.009>
- Herrera, B., Carracedo, A., Diez-Zaera, M., Guzmán, M., & Velasco, G. (2005). p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Letters*, 579(22), 5084–5088. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.021>
- Hocsak, E., Szabo, V., Kalman, N., Antus, C., Cseh, A., Sumegi, K., Eros, K., Hegedus, Z., Gallyas, F., Sumegi, B., & Racz, B. (2017). PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 108(April), 770–784. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.018>
- Howlett, A. C. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 161–202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Hu, S., Niu, H., Minkin, P., Orwick, S., Shimada, A., Inaba, H., Dahl, G. V. H., Rubnitz, J., & Baker, S. D. (2008). Comparison of antitumor effects of multitargeted tyrosine kinase inhibitors in acute myelogenous leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(5), 1110–1120. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2218>
- Iansante, V., Choy, P. M., Fung, S. W., Liu, Y., Chai, J. G., Dyson, J., Del Rio, A., D'Santos, C., Williams, R., Chokshi, S., Anders, R. A., Bubici, C., & Papa, S. (2015). PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by

- inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8882>
- Jacobsson, S. O. P., Rongård, E., Stridh, M., Tiger, G., & Fowler, C. J. (2000). Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochemical Pharmacology*, 60(12), 1807–1813. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00492-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00492-5)
- Jain, M., Cui, L., Brenner, D. A., Wang, B., Handy, D. E., Leopold, J. A., Loscalzo, J., Apstein, C. S., & Liao, R. (2004). Increased Myocardial Dysfunction after Ischemia-Reperfusion in Mice Lacking Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Circulation*, 109(7), 898–903. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000112605.43318.CA>
- Jordà, M. A., Rayman, N., Tas, M., Verbakel, S. E., Battista, N., Van Lom, K., Lawenberg, B., Maccarrone, M., & Delwel, R. (2004). The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood*, 104(2), 526–534. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4357>
- Jordà, M. A., Verbakel, S. E., Valk, P. J. M., Vankan-Berkhoudt, Y. V., Maccarrone, M., Finazzi-Agró, A., Löwenberg, B., & Delwel, R. (2002). Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*, 99(8), 2786–2793. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2786>
- Jordà, M. A., Verbakel, S. E., Valk, P. J. M., Vankan-berkhoudt, Y. V., Finazzi-agrò, A., Löwenberg, B., & Delwel, R. (2009). *Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidono.* 99(8), 2786–2793. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2786>
- Kampa-Schittenhelm, K. M., Salitzky, O., Akmut, F., Illing, B., Kanz, L., Salih, H. R., & Schittenhelm, M. M. (2016). Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-2029-8>
- Kayser, S., & Levis, M. J. (2018). Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 180(4), 484–500. <https://doi.org/10.1111/bjh.15032>
- Khoury JD, Solary E, Ablu O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison

- C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703-1719. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1. Epub 2022 Jun 22. PMID: 35732831; PMCID: PMC9252913.
- Kohli, L., & Passequé, E. (2014). Surviving change: The metabolic journey of hematopoietic stem cells. *Trends in Cell Biology*, 24(8), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.001>
- Koichi Ikuta, Uchida, N., Jeff Friedman, & Weissman, I. L. (1992). LYMPHOCYTE DEVELOPMENT FROM STEM CELLS. *Annu. Rev. Immunol*, 25(2), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.03.006>
- Kreitz, J., Schönfeld, C., Seibert, M., Stolp, V., Alshamleh, I., Oellerich, T., Steffen, B., Schwalbe, H., Schnütgen, F., Kurrle, N., & Serve, H. (2019). Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells*, 8(8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/cells8080805>
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111(3), 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01036-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01036-X)
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. E., Therneau, T. M., & Greipp, P. R. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(1), 21–33. <https://doi.org/10.4065/78.1.21>
- Laubach, J. P., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2010). The evolution and impact of therapy in multiple myeloma. *Medical Oncology*, 27(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9442-2>
- Lauckner, J. E., Jensen, J. B., Chen, H. Y., Lu, H. C., Hille, B., & Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2699–2704. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711278105>
- Lee, S. F., Newton, C., Widen, R., Friedman, H., & Klein, T. W. (2001). Differential expression of cannabinoid CB2 receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *European Journal of Pharmacology*, 423(2–3), 235–241. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01122-](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01122-)

0

- Leni, Z., Parakkal, G., & Arcaro, A. (2013). Emerging metabolic targets in the therapy of hematological malignancies. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/946206>
- Lenzen, S. (2014). A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: History and current status. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12189–12194. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.557314>
- Li, X., Li, C., Jin, J., Wang, J., Huang, J., Ma, Z., Huang, X., He, X., Zhou, Y., Xu, Y., Yu, M., Huang, S., Yan, X., Li, F., Pan, J., Wang, Y., Yu, Y., & Jin, J. (2018). High PARP-1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP-1 inhibitor and SAHA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects. *EBioMedicine*, 38, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.025>
- Lim, M. P., Devi, L. A., & Rozenfeld, R. (2011). Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death and Disease*, 2(6), e170-11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.52>
- Löwenberg, B., Griffin, J. D., & Tallman, M. S. (2003). Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 82–101. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.82>
- Luo, Y., Tanigawa, K., Kawashima, A., Ishido, Y., Ishii, N., & Suzuki, K. (2020). The function of peroxisome proliferator-activated receptors PPAR- γ and PPAR- δ in mycobacterium leprae-induced foam cell formation in host macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008850>
- Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological Reviews*, 84(4), 1051–1095. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2003>
- Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: Where they are and what they do. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(SUPPL. 1), 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x>
- Majeti, R., Park, C. Y., & Weissman, I. L. (2007). Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*, 1(6), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001>
- Malfitano, A. M., Basu, S., Maresz, K., Bifulco, M., & Dittel, B. N. (2014). What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Seminars in Immunology*, 26(5), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.04.002>

- Maraninchi, D., Blaise, D., Rio, B., Leblond, V., Dreyfus, F., Gluckman, E., Guyotat, D., Pico, J. L., Michallet, M., Ifrah, N., & Bordignon, A. (1987). Impact of T-Cell Depletion on Outcome of Allogeneic Bone-Marrow Transplantation for Standard-Risk Leukaemias. *The Lancet*, *330*(8552), 175–178. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)90763-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)90763-X)
- Martire, S., Fuso, A., Mosca, L., Forte, E., Correani, V., Fontana, M., Scarpa, S., Maras, B., & D'Erme, M. (2016). Bioenergetic impairment in animal and cellular models of Alzheimer's disease: PARP-1 inhibition rescues metabolic dysfunctions. *Journal of Alzheimer's Disease*, *54*(1), 307–324. <https://doi.org/10.3233/JAD-151040>
- Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M. P., & Parolaro, D. (2004). Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *308*(3), 838–845. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.061002>
- Matsuda, L. a, Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, a C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, *346*(6284), 561–564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>
- Mayle, A., Luo, M., Jeong, M., & Goodell, M. A. (2013). Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry Part A*, *83 A* (1), 27–37. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22093>
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, *50*(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1967). The absolute configuration of δ 1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Letters*, *8*(12), 1109–1111. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)90646-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)90646-4)
- Mesbahi, Y., Trahair, T. N., Lock, R. B., & Connerty, P. (2022). Exploring the Metabolic Landscape of AML: From Haematopoietic Stem Cells to Myeloblasts and Leukaemic Stem Cells. *Frontiers in Oncology*, *12*(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.807266>
- Morad, S. A. F., & Cabot, M. C. (2013). Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, *13*(1), 51–65. <https://doi.org/10.1038/nrc3398>
- Morales, P., Lago-Fernandez, A., Hurst, D. P., Sotudeh, N., Brailoiu, E., Reggio, P. H., Abood, M. E., & Jagerovic, N. (2020). Therapeutic Exploitation of GPR18: Beyond the Cannabinoids? *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(23), 14216–14227.

- <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00926>
- Morelli, M. B., Offidani, M., Alesiani, F., Discepoli, G., Liberati, S., Olivieri, A., Santoni, M., Santoni, G., Leoni, P., & Nabissi, M. (2014). The effects of cannabidiol and its synergism with bortezomib in multiple myeloma cell lines. A role for transient receptor potential vanilloid type-2. *International Journal of Cancer*, *134*(11), 2534–2546. <https://doi.org/10.1002/ijc.28591>
- Mulford, D. A., & Jurcic, J. G. (2004). Antibody-based treatment of acute myeloid leukaemia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *4*(1), 95–105. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.1.95>
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993a). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993b). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Ng, A. P., & Alexander, W. S. (2017). Haematopoietic stem cells: Past, present and future. *Cell Death Discovery*, *3*(December 2016), 2–5. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.2>
- O’Sullivan, S. E. (2016). An update on PPAR activation by cannabinoids. *British Journal of Pharmacology*, *173*(12), 1899–1910. <https://doi.org/10.1111/bph.13497>
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., & Hannun, Y. A. (1993). Programmed Cell Death Induced by Ceramide Author(s): Lina M. Obeid, Corinne M. Linardic, Linda A. Karolak and Yusuf A. Hannun Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2881222> JSTO. *Science*, *259*(5102), 1769–1771.
- Okazaki, T., Bielawska, A, Bell, R. M., & Hannun, Y. a. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25- dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(26), 15823–15831.
- Onaivi, E. S. (2008). An endocannabinoid hypothesis of drug reward and drug addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1139*(Table 1), 412–421. <https://doi.org/10.1196/annals.1432.056>
- Orfao, A., Matarraz, S., Pérez-Andrés, M., Almeida, J., Teodosio, C., Berkowska, M. A., & van Dongen, J. J. M. (2019). Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. *Journal of Immunological Methods*, *475*, 112684. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112684>
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low / Negative

- Hematopoietic Stem Cell. *Science*, 273(5272), 242–245.
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*. 2005 Apr 6;24(7):1375-86. doi: 10.1038/sj.emboj.7600614. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15775970; PMCID: PMC1142539.
- Pandey, R., Hegde, V. L., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2011). Targeting cannabinoid receptors as a novel approach in the treatment of graft-versus-host disease: Evidence from an experimental murine model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(3), 819–828. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.182717>
- Papathanasiou, P., Tunngley, R., Pattabiraman, D. R., Ye, P., Gonda, T. J., Whittle, B., Hamilton, A. E., Cridland, S. O., Lourie, R., & Perkins, A. C. (2010). *HEMATOPOIESIS AND STEM CELLS A recessive screen for genes regulating hematopoietic stem cells*. 116(26), 5849–5858. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-269951>.The
- Parekh, C., & Crooks, G. M. (2013). Critical differences in hematopoiesis and lymphoid development between humans and mice. *Journal of Clinical Immunology*, 33(4), 711–715. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9844-3>
- Park, S. H., Noh, S. J., Kim, K. M., Bae, J. S., Kwon, K. S., Jung, S. H., Kim, J. R., Lee, H., Chung, M. J., Moon, W. S., Kang, M. J., & Jang, K. Y. (2015). Expression of DNA damage response molecules PARP1, γ H2AX, BRCA1, and BRCA2 predicts poor survival of breast carcinoma patients. *Translational Oncology*, 8(4), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.04.004>
- Pashaiefar, H., Yaghmaie, M., Tavakkoly-Bazzaz, J., Ghaffari, S. H., Alimoghaddam, K., Momeny, M., Izadifard, M., Kasaeian, A., & Ghavamzadeh, A. (2018). Significance of PARP1 expression levels in patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Oncology*, 29(Supplement 9), ix87. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy437>
- Patinkin, D., Milman, G., Breuer, A., Fride, E., & Mechoulam, R. (2008). Endocannabinoids as positive or negative factors in hematopoietic cell migration and differentiation. *European Journal of Pharmacology*, 595(1–3), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.002>
- Pennisi, R., Albanesi, J., Ascenzi, P., Nervi, C., & di Masi, A. (2018). Are DNA damage response kinases a target for the differentiation treatment of acute myeloid leukemia? *IUBMB Life*, 70(11), 1057–1066. <https://doi.org/10.1002/iub.1918>
- Perera, M. N., Lin, S. H., Peterson, Y. K., Bielawska, A., Szulc, Z. M., Bittman, R., & Colombini, M. (2012). Bax and Bcl-xL exert their regulation on different sites of the ceramide channel. *Biochemical Journal*, 445(1), 81–91.

- <https://doi.org/10.1042/BJ20112103>
- Pertwee, R. G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: An overview. *International Journal of Obesity*, 30, S13–S18. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803272>
- Pertwee, R. G., Howlett, a C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Marzo, V. Di, Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., & Kunos, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB 1 and CB 2. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 588–631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004.588>
- Pertwee, R. G., & Ross, R. A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2–3), 101–121. <https://doi.org/10.1054/plf.2001.0341>
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E., & Hannun, Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1585(2–3), 114–125. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00331-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00331-1)
- Rajkumar, S. V. (2018). Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 93(8), 1091–1110. <https://doi.org/10.1002/ajh.25117>
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., ... Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 15(12), e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
- Ray Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(10), 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
- Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2004). Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Reports*, 5(6), 643–648. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400153>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 152(7), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- San Miguel, J. F., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., & Orfao, A. (1995). Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Bailliere's Clinical*

- Haematology*, 8(4), 735–759. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(05\)80257-4](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80257-4)
- Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P., & Guzmán, M. (1998). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Letters*, 436(1), 6–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01085-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01085-0)
- Sánchez, C., Gómez del Pulgar, T., Rueda, D., Velasco, G., Galve-Roperh, I., Guzmán, M., De Ceballos, M. L., Corbacho, C., Ramón y Cajal, S., & Huffman, J. W. (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor. *Cancer Research*, 61(15), 5784–5789.
- Sarfraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Cannabinoids for cancer treatment: Progress and promise. *Cancer Research*, 68(2), 339–342. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2785>
- Schmelzer, K., Fahy, E., Subramaniam, S., & Dennis, E. A. (2007). The Lipid Maps Initiative in Lipidomics. *Methods in Enzymology*, 432(07), 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)32007-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)32007-7)
- Seita, J., & Weissman, I. (2010). Published in final edited form as: Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev.Syst. Biol.Med.*, 2(5), 1–20. <https://doi.org/10.1002/wsbm.86.Hematopoietic>
- Selvam SP, Ogretmen B. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in cancer therapeutics and drug resistance. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(216):3-27. doi: 10.1007/978-3-7091-1511-4_1. PMID: 23563649.
- Shah, N., Aiello, J., Avigan, D. E., Berdeja, J. G., Borrello, I. M., Chari, A., Cohen, A. D., Ganapathi, K., Gray, L., Green, D., Krishnan, A., Lin, Y., Manasanch, E., Munshi, N. C., Nooka, A. K., Rapoport, A. P., Smith, E. L., Vij, R., & Dhodapkar, M. (2020). The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of multiple myeloma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000734>
- Shipley, J. L., & Butera, J. N. (2009). Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*, 37(6), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.04.002>
- Siskind, L. J. (2005). Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(3), 143–153. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-6567-7>
- Song, H., Yoon, S. P., & Kim, J. (2016). Poly(ADP-ribose) polymerase regulates glycolytic activity in kidney proximal tubule epithelial cells. *Anatomy and Cell Biology*, 49(2), 79–87. <https://doi.org/10.5115/acb.2016.49.2.79>
- Song, S., Kong, X., Borlongan, C., Sava, V., & Sanchez-Ramos, J. (2021). Granulocyte colony-stimulating factor enhances brain repair following traumatic brain injury without requiring activation of cannabinoid receptors. *Cannabis and Cannabinoid*

- Research*, 6(1), 48–57. <https://doi.org/10.1089/can.2019.0090>
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., & Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241(4861), 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.2898810>
- Starkus, J., Jansen, C., Shimoda, L. M. N., Stokes, A. J., Small-Howard, A. L., & Turner, H. (2019). Diverse TRPV1 responses to cannabinoids. *Channels*, 13(1), 172–191. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1619436>
- Stiban, J., Caputo, L., & Colombini, M. (2008). Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *Journal of Lipid Research*, 49(3), 625–634. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700480-JLR200>
- Stone, R. M., O'Donnell, M. R., & Sekeres, M. a. (2004). Acute myeloid leukemia. *Hematology*, 2004(1), 98–117. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2004.1.98>
- Su, J., Zhou, L., Xia, M., Xu, Y., Xiang, X., & Sun, L. (2014). Bcl-2 Family Proteins Are Involved in the Signal Crosstalk between Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction in Tumor Chemotherapy Resistance. *BioMed Research International*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/234370>
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6. doi: 10.1038/17135. PMID: 9989411.
- Sutherland, D. R., & Keating, A. (1992). *Antigen: Structure, Biology , Clinical Applications and Potential*. 115–129.
- T.W., K., C.A., N., Klein, T. W., Newton, C. A., Friedman, H., T.W., K., C.A., N., Klein, T. W., Newton, C. A., Friedman, H., T.W., K., C.A., N., Klein, T. W., Newton, C. A., & Friedman, H. (2001). Cannabinoids and the immune system. *Pain Research and Management*, 6(2), 95–101. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=11854771%0Ahttp://www.pulsus.com/journals/Login.jsp?sCurrPg=Login&theAction=%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emex&NEWS=N&AN=32780611%0Ahttp://www.ncbi.nlm>
- Tallman, M. S., Gilliland, D. G., & Rowe, J. M. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Drug Therapy*, 106(4), 1154–1163. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0178.Reprints>
- Taylor, J., Xiao, W., & Abdel-Wahab, O. (2017). Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, 130(4), 410–423. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-734541>

- Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro. *British Journal of Pharmacology*, *150*(5), 613–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133>
- Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, *14*(2), 213. <https://doi.org/doi:10.2307/3570892>
- Tripodo, C., Sangaletti, S., Piccaluga, P. P., Prakash, S., Franco, G., Borrello, I., Orazi, A., Colombo, M. P., & Pileri, S. A. (2011). The bone marrow stroma in hematological neoplasms—a guilty bystander. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *8*(8), 456–466. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.31>
- Valk, P. J. M., & Delwel, R. (1998). The peripheral cannabinoid receptor, Cb2, in retrovirally-induced leukemic transformation and normal hematopoiesis. *Leukemia and Lymphoma*, *32*(1–2), 29–43. <https://doi.org/10.3109/10428199809059244>
- Valk, P., Verbakel, S., Vankan, Y., Hol, S., Mancham, S., Ploemacher, R., Mayen, A., Löwenberg, B., & Delwel, R. (1997). Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood*, *90*(4), 1448–1457. https://doi.org/10.1182/blood.v90.4.1448.1448_1448_1457
- Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., & Guzmán, M. (2007). Cannabinoids and gliomas. *Molecular Neurobiology*, *36*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s12035-007-0002-5>
- Velasco, G., Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Blázquez, C., Haro, A., & Guzmán, M. (2005). Cannabinoids and ceramide: Two lipids acting hand-by-hand. *Life Sciences*, *77*(14), 1723–1731. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.015>
- Velasco, G., Sánchez, C., & Guzmán, M. (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer*, *12*(6), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nrc3247>
- Vielhaber, G., Brade, L., Lindner, B., Pfeiffer, S., Wepf, R., Hintze, U., Wittern, K. P., & Brade, H. (2001). Mouse anti-ceramide antiserum: A specific tool for the detection of endogenous ceramide. *Glycobiology*, *11*(6), 451–457. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.6.451>
- Vorbach, S., Gründer, A., Zhou, F., Koellerer, C., Jutzi, J. S., Simoni, M., Riccetti, L., Valk, P. J., Sanders, M. A., Müller-Tidow, C., Nofer, J. R., Pahl, H. L., & Potì, F. (2020). Enhanced expression of the sphingosine-1-phosphate-receptor-3 causes acute myelogenous leukemia in mice. *Leukemia*, *34*(3), 721–734. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0577-7>
- Wallington-Beddoe, C. T., Bradstock, K. F., & Bendall, L. J. (2013). Oncogenic

- properties of sphingosine kinases in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 161(5), 623–638. <https://doi.org/10.1111/bjh.12302>
- Wang, K., Wang, Q., Li, Q., Zhang, Z., Gao, J., Fan, C., Sun, B., & Ni, Q. (2021). Cannabinoid WIN 55,212-2 Inhibits Human Glioma Cell Growth by Triggering ROS-Mediated Signal Pathways. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6612592>
- Wang, Y., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: A key event in parthanatos. *Experimental Neurology*, 218(2), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.03.020>
- Wei, H., & Yu, X. (2016). Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(3), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.001>
- Westphal, D., Dewson, G., Menard, M., Frederick, P., Iyer, S., Bartolo, R., Gibson, L., Czabotar, P. E., Smith, B. J., Adams, J. M., & Kluck, R. M. (2014). Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(39), E4076–E4085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415142111>
- Winkler, I. G., Wiercinska, E., Barbier, V., Nowlan, B., Bonig, H., & Levesque, J. P. (2016). Mobilization of hematopoietic stem cells with highest self-renewal by G-CSF precedes clonogenic cell mobilization peak. *Experimental Hematology*, 44(4), 303-314.e1. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.01.001>
- Wray, J., Williamson, E. A., Singh, S. B., Wu, Y., Cogle, C. R., Weinstock, D. M., Zhang, Y., Lee, S. H., Zhou, D., Shao, L., Hauer-Jensen, M., Pathak, R., Klimek, V., Nickoloff, J. A., & Hromas, R. (2013). PARP1 is required for chromosomal translocations. *Blood*, 121(21), 4359–4365. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-460527>
- Xie, S. Z., Garcia-Prat, L., Voisin, V., Ferrari, R., Gan, O. I., Wagenblast, E., Kaufmann, K. B., Zeng, A. G. X., Takayanagi, S. ichiro, Patel, I., Lee, E. K., Jargstorf, J., Holmes, G., Romm, G., Pan, K., Shoong, M., Vedi, A., Luberto, C., Minden, M. D., ... Dick, J. E. (2019). Sphingolipid Modulation Activates Proteostasis Programs to Govern Human Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*, 25(5), 639-653.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.09.008>
- Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K. C., Xu, Y., & Zhang, L. (2011). Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nature Chemical Biology*, 7(5), 296–303. <https://doi.org/10.1038/nchembio.552>
- Yadav, R. K., Soo-Wan Chae, Kim, H.-R., & Chae, H. J. (2014). Endoplasmic

- Reticulum Stress and Cancer. *JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 19(2), 75–88. <https://doi.org/10.1002/masy.19910460156>
- Yanagawa, T., Funasaka, T., Tsutsumi, S., Hu, H., Watanabe, H., & Raz, A. (2007). Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor activities by the poly(ADP-ribose) polymerase family-14. *Cancer Research*, 67(18), 8682–8689. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1586>
- Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Månsson, R., Sigvardsson, M., & Jacobsen, S. E. W. (2005). Identification of Lin-Sca1+kit+CD34 +Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, 105(7), 2717–2723. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2159>
- Yang, Y., Huynh, N., Dumesny, C., Wang, K., He, H., & Nikfarjam, M. (2020). Cannabinoids inhibited pancreatic cancer via p-21 activated kinase 1 mediated pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms21218035>
- Yates, J., Glidewell, O., Wiernik, P., Cooper, M. R., Steinberg, D., Dosik, H., Levy, R., Hoagland, C., Henry, P., Gottlieb, A., Cornell, C., Berenberg, J., Hutchison, J. L., Raich, P., Nissen, N., Ellison, R. R., Frelick, R., James, G. W., Falkson, G., ... Holland, J. F. (1982). Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: A CALGB study. *Blood*, 60(2), 454–462. <https://doi.org/10.1182/blood.v60.2.454.454>
- Yeshurun, M., Shpilberg, O., Herscovici, C., Shargian, L., Dreyer, J., Peck, A., Israeli, M., Levy-Assaraf, M., Gruenewald, T., Mechoulam, R., Raanani, P., & Ram, R. (2015). Cannabidiol for the Prevention of Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Results of a Phase II Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(10), 1770–1775. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.05.018>
- Young, P. E., Baumhueter, S., & Lasky, L. A. (1995). The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*, 85(1), 96–105. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.1.96.bloodjournal85196>
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 2002 Jul 12;297(5579):259-63. doi: 10.1126/science.1072221. PMID: 12114629.
- Zhou, K., & Blom, T. (2015). Trafficking and functions of bioactive sphingolipids: Lessons from cells and model membranes. *Lipid Insights*, 2015, 11–20. <https://doi.org/10.4137/LPI.S31615>

ANEXO I

GENES CUYA EXPRESIÓN DISMINUYEN TRAS EL TRATAMIENTO CON WIN-55			
Nombre de la proteína	Nombre del gen	Fold change	p-Val
meiotic double-stranded break formation protein 1	MEI1	-47,49	1,55E-17
DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	-45,54	1,41E-15
WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	WIPI1	-25,82	1,07E-15
angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5; ribonuclease, RNase A family, 4	ANG; RNASE4	-25,79	5,12E-15
FIC domain containing	FICD	-22,29	1,18E-14
cystathionine gamma-lyase	CTH	-20,32	2,53E-16
ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	CHAC1	-20,02	3,53E-12
epithelial splicing regulatory protein 1	ESRP1	-19,95	2,55E-16
muscleblind-like splicing regulator 2	MBNL2	-15,02	1,41E-10
endoplasmic reticulum oxidoreductase beta	ERO1B	-14,91	2,83E-14
stromal cell-derived factor 2-like 1	SDF2L1	-14,15	5,48E-12
sestrin 2	SESN2	-12,51	7,11E-16
cysteine rich with EGF-like domains 2	CRELD2	-11,25	2,91E-17
coiled-coil domain containing 163, pseudogene	CCDC163P	-11,23	8,76E-13
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-11,15	2,58E-12
phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PCK2	-10,74	1,17E-13
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	-10,19	6,37E-15
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-10,17	5,41E-16
aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	ALDH1L2	-10,15	1,42E-13
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-9,99	1,82E-15
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9	SLC6A9	-9,98	5,04E-14
SEC24 homolog D, COPII coat complex component	SEC24D	-9,7	1,29E-13
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-9,21	2,50E-13
GDP-mannose pyrophosphorylase B	GMPPB	-9,08	1,64E-13
homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HERPUD1	-9,04	2,25E-15
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-8,97	2,48E-13
DNA damage inducible transcript 4	DDIT4	-8,87	3,79E-13
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-8,85	1,73E-13
activating transcription factor 3	ATF3	-8,4	2,73E-10
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-8,39	1,43E-14
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-8,38	2,65E-14
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-8,18	7,34E-13
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	-8,17	3,23E-14
G protein-coupled receptor 84	GPR84	-8,08	5,96E-11
chondroitin polymerizing factor	CHPF	-8,07	1,32E-14
purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 7	P2RX7	-8,03	4,38E-14
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-7,76	9,40E-15
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-7,69	5,57E-13
phosphoprotein membrane anchor with	PAG1	-7,66	3,59E-13

glycosphingolipid microdomains 1 triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	TREML2	-7,5	4,20E-10
protein disulfide isomerase family A, member 4	PDIA4	-7,23	2,01E-14
cyclin G2	CCNG2	-7,19	2,03E-14
mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	MANF	-7,16	7,71E-14
cyclin-dependent kinase 2 associated protein 2	CDK2AP2	-7,12	6,04E-14
Cbl proto-oncogene B, E3 ubiquitin protein ligase	CBLB	-7,1	1,74E-10
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-7,09	4,06E-16
syntaxin 5	STX5	-7,01	8,87E-11
Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 7184	HSP90B1	-6,88	1,96E-10
phospholipid phosphatase 5	PLPP5	-6,86	2,39E-13
tribbles pseudokinase 3	TRIB3	-6,82	6,28E-13
NLR family, pyrin domain containing 12	NLRP12	-6,77	2,67E-10
metallothionein 1F	MT1F	-6,69	2,71E-11
GTP binding protein 2	GTPBP2	-6,66	9,73E-14
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-6,54	5,72E-15
hydroxycarboxylic acid receptor 2	HCAR2	-6,51	2,01E-10
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-6,48	3,84E-14
FK506 binding protein 14	FKBP14	-6,48	8,39E-11
phosphoglucomutase 3	PGM3	-6,45	1,83E-13
transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	TRPM8	-6,33	2,13E-10
ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3	ARFGAP3	-6,33	1,63E-13
glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1	GFPT1	-6,31	2,01E-13
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-6,23	4,13E-14
microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	MAP1LC3B	-6,16	8,34E-13
eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	EIF2AK3	-6,12	4,52E-14
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-5,95	4,37E-12
testin LIM domain protein	TES	-5,91	1,26E-11
family with sequence similarity 129, member A	FAM129A	-5,86	7,54E-14
cysteine rich with EGF-like domains 1	CRELD1	-5,82	1,01E-09
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-5,63	2,94E-10
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-5,59	6,49E-09
heat shock protein 70kDa family, member 13	HSPA13	-5,57	6,37E-14
amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3; microRNA 6831	APBB3; MIR6831	-5,49	9,64E-11
ras homolog family member Q	RHOQ	-5,46	1,54E-13
GDP-mannose pyrophosphorylase A	GMPPA	-5,38	1,49E-14
hydroxycarboxylic acid receptor 3	HCAR3	-5,28	4,02E-09
HMG-box transcription factor 1	HBP1	-5,27	1,96E-13
synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	SYVN1	-5,13	3,96E-11
tubulin, epsilon 1	TUBE1	-5,11	1,54E-11
FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	FYN	-5,05	1,54E-13

misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator; misato family member 2	MSTO1; MSTO2P	-5,02	8,96E-14
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-4,99	5,91E-11
EML2 antisense RNA 1	EML2-AS1	-4,98	1,50E-10
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-4,84	6,21E-14
ribosome binding protein 1	RRBP1	-4,83	1,64E-09
interleukin 1 beta	IL1B	-4,83	7,59E-11
nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	-4,78	1,56E-12
baculoviral IAP repeat containing 3	BIRC3	-4,78	7,22E-09
zinc finger protein 70	ZNF70	-4,76	1,28E-11
X-box binding protein 1	XBP1	-4,72	4,31E-13
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	-4,71	1,68E-11
transmembrane protein 243, mitochondrial	TMEM243	-4,69	3,71E-13
derlin 2	DERL2	-4,67	1,91E-09
protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	PPP1R15A	-4,64	4,55E-11
ets variant 5	ETV5	-4,63	2,46E-10
VCP-interacting membrane selenoprotein	VIMP	-4,56	1,29E-11
arrestin domain containing 3	ARRDC3	-4,55	9,08E-12
interleukin 23, alpha subunit p19	IL23A	-4,55	3,19E-09
peroxisomal biogenesis factor 5-like	PEX5L	-4,55	1,28E-07
UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	-4,54	3,53E-12
solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	SLC7A11	-4,49	2,71E-13
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-4,48	4,25E-09
MAX dimerization protein 1	MXD1	-4,47	3,16E-12
inhibin beta E	INHBE	-4,44	4,79E-07
cAMP responsive element binding protein 3	CREB3	-4,42	5,13E-12
Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	DNAJB11	-4,42	2,18E-12
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-4,41	8,99E-10
sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	SEL1L	-4,39	1,24E-13
glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble	GOT1	-4,39	3,72E-13
fibronectin type III domain containing 3A	FNDC3A	-4,37	8,00E-12
sphingomyelin synthase 2	SGMS2	-4,37	2,03E-11
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-4,35	4,32E-10
signal transducer and activator of transcription 2	STAT2	-4,34	4,29E-11
chromosome 11 open reading frame 24	C11orf24	-4,31	1,03E-11
adhesion molecule with Ig-like domain 3	AMIGO3	-4,3	2,67E-09
NLR family, CARD domain containing 4	NLRC4	-4,25	3,96E-07
TSC22 domain family, member 3	TSC22D3	-4,24	1,15E-08
C-type lectin domain family 7, member A	CLEC7A	-4,22	5,85E-07
triggering receptor expressed on myeloid cells 1	TREM1	-4,16	7,61E-10
golgin A2	GOLGA2	-4,16	2,41E-11
lysine (K)-specific demethylase 6B	KDM6B	-4,11	3,44E-07
TSPY-like 2	TSPYL2	-4,08	7,36E-10
nicotinamide riboside kinase 1	NMRK1	-4,07	1,54E-07
regulator of G-protein signaling 16	RGS16	-4,06	2,91E-09
cyclin-dependent kinase-like 5	CDKL5	-4,04	2,24E-08

jun proto-oncogene	JUN	-4,02	3,13E-10
golgin A5	GOLGA5	-4,01	3,88E-09
endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	ERN1	-3,98	3,38E-10
TGFB-induced factor homeobox 1	TGIF1	-3,96	3,74E-13
cAMP responsive element binding protein 3-like 2	CREB3L2	-3,95	9,39E-11
cystinosin, lysosomal cystine transporter	CTNS	-3,94	1,37E-08
acyl-CoA dehydrogenase family, member 11	ACAD11	-3,93	5,11E-10
asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	ASNS	-3,92	1,63E-11
calmegin	CLGN	-3,91	7,50E-06
heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	HSPA5	-3,9	3,66E-13
kelch-like family member 6	KLHL6	-3,9	1,46E-11
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	DNAJC12	-3,84	1,82E-11
zinc finger, AN1-type domain 2A	ZFAND2A	-3,84	3,10E-10
Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein-like	BET1L	-3,79	2,77E-11
activin A receptor type IIA	ACVR2A	-3,77	5,21E-06
interferon regulatory factor 1	IRF1	-3,76	7,74E-07
transmembrane protein 106A	TMEM106A	-3,73	8,43E-09
golgin B1	GOLGB1	-3,68	4,96E-11
Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein	BET1	-3,67	1,96E-10
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-3,66	1,13E-07
transmembrane protein 39A	TMEM39A	-3,64	3,57E-12
metallothionein 1H	MT1H	-3,63	2,13E-10
coatamer protein complex subunit gamma 1	COPG1	-3,62	5,70E-12
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A	PIGA	-3,52	5,46E-11
TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	-3,51	3,04E-07
chromosome 14 open reading frame 28	C14orf28	-3,48	1,71E-07
butyrophilin, subfamily 3, member A1	BTN3A1	-3,48	1,16E-10
StAR-related lipid transfer domain containing 5	STARD5	-3,48	4,89E-06
transmembrane protein 241	TMEM241	-3,47	5,74E-10
transmembrane protein 154	TMEM154	-3,44	1,69E-09
triple QxxK/R motif containing	TRIQK	-3,4	5,17E-09
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	ACSL1	-3,37	2,40E-10
coiled-coil domain containing 174	CCDC174	-3,37	1,74E-09
perilipin 2	PLIN2	-3,37	1,46E-09
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	DNAJC3	-3,37	5,28E-13
RWD domain containing 2A	RWDD2A	-3,36	5,96E-09
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	DNAJC6	-3,35	4,73E-07
Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	-3,32	5,74E-10
RAB33B, member RAS oncogene family	RAB33B	-3,31	9,39E-10
cell cycle progression 1; microRNA 628	CCPG1; MIR628	-3,31	1,67E-11
cat eye syndrome chromosome region, candidate 2	CECR2	-3,29	1,02E-08
patatin-like phospholipase domain containing 8	PNPLA8	-3,28	4,72E-12
golgi phosphoprotein 3-like	GOLPH3L	-3,28	2,11E-09
macrophage stimulating 1-like	MST1L	-3,27	3,23E-08

very low density lipoprotein receptor	VLDLR	-3,27	4,78E-10
activating transcription factor 5; microRNA 4751	ATF5; MIR4751	-3,26	4,59E-10
praja ring finger 2, E3 ubiquitin protein ligase	PJA2	-3,26	5,77E-11
transmembrane protein 41B	TMEM41B	-3,26	1,71E-10
metallothionein 1B; metallothionein 1C, pseudogene	MT1B; MT1CP	-3,26	1,02E-09
transmembrane protein 214	TMEM214	-3,25	4,71E-12
solute carrier family 10, member 7	SLC10A7	-3,25	9,12E-12
small integral membrane protein 14	SMIM14	-3,25	9,77E-06
TMED7-TICAM2 readthrough; toll-like receptor adaptor molecule 2; transmembrane p24 trafficking protein 7	TMED7-TICAM2; TICAM2; TMED7	-3,24	7,43E-12
transmembrane protein 50B	TMEM50B	-3,24	1,04E-10
solute carrier family 9, subfamily A (NHE1, cation proton antiporter 1), member 1	SLC9A1	-3,24	1,12E-08
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	NFKB2	-3,23	4,16E-09
proline-rich coiled-coil 1	PRRC1	-3,23	3,12E-12
testis-specific kinase 2	TESK2	-3,23	1,29E-05
OTU deubiquitinase 1	OTUD1	-3,22	1,59E-09
zinc finger CCCH-type containing 12C	ZC3H12C	-3,21	1,36E-08
alanyl-tRNA synthetase	AARS	-3,19	1,95E-11
nuclear transcription factor, X-box binding-like 1	NFXL1	-3,18	2,10E-10
cytohesin 1 interacting protein	CYTIP	-3,16	9,12E-11
osteoclast associated, immunoglobulin-like receptor	OSCAR	-3,16	3,72E-06
LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3	LYSMD3	-3,15	4,91E-10
cell division cycle 6	CDC6	-3,14	1,95E-11
selenoprotein K; selenoprotein K [Source:EntrezGene;Acc:58515];	SELK	-3,14	4,43E-08
tumor necrosis factor	TNF	-3,12	1,26E-07
senataxin	SETX	-3,11	1,80E-11
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-3,1	9,08E-06
bestrophin 1	BEST1	-3,1	7,75E-07
T-cell activation RhoGTPase activating protein	TAGAP	-3,1	3,59E-10
coiled-coil domain containing 186; microRNA 2110	CCDC186; MIR2110	-3,1	1,50E-07
nuclear factor, interleukin 3 regulated	NFIL3	-3,09	4,44E-10
ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	RPS6KA2	-3,09	1,42E-07
metallothionein 1A	MT1A	-3,08	1,85E-09
ADP-ribosylation factor like GTPase 5B	ARL5B	-3,08	1,17E-08
ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	EDEM1	-3,07	1,21E-11
solute carrier family 35, member B1	SLC35B1	-3,05	5,35E-12
t-complex 11, testis-specific-like 2	TCP11L2	-3,05	8,83E-07
metallothionein 1G	MT1G	-3,04	1,37E-09
AP2 associated kinase 1	AAK1	-3,03	5,74E-11

cyclin Y like 1; microRNA 4775	CCNYL1; MIR4775	-3,03	1,50E-10
glycerophosphocholine phosphodiesterase 1	GPCPD1	-3,03	2,37E-07
zinc finger CCCH-type containing 6	ZC3H6	-3,02	1,33E-07
thioredoxin interacting protein	TXNIP	-3,01	6,44E-10
ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2	EDEM2	-2,99	1,04E-10
musculin	MSC	-2,97	1,14E-07
SUN domain containing ossification factor	SUCO	-2,97	5,74E-07
oxysterol binding protein	OSBP	-2,97	1,21E-09
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	-2,97	1,24E-05
transmembrane protein 169	TMEM169	-2,97	5,93E-05
Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 17A (AKAP17A), transcript variant 1, mRNA.	AKAP17A; SFRS17A	-2,96	1,60E-07
cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	CPEB4	-2,96	3,20E-07
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	SLC25A4	-2,95	1,52E-11
metallothionein 2A	MT2A	-2,95	2,38E-09
kelch domain containing 7B	KLHDC7B	-2,94	2,73E-05
solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	SLC33A1	-2,94	6,85E-09
prion protein	PRNP	-2,93	4,96E-10
chibby homolog 1 (Drosophila)	CBY1	-2,93	2,50E-06
peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	PECR	-2,92	1,18E-09
metallothionein 1M	MT1M	-2,92	5,06E-09
pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 2, pseudogene	PDXDC2P	-2,91	1,59E-09
zinc finger, AN1-type domain 3	ZFAND3	-2,91	5,74E-10
coiled-coil domain containing 149	CCDC149	-2,9	4,14E-07
purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 4	P2RX4	-2,9	2,07E-08
serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	SERPINI1	-2,89	8,79E-07
endoplasmic reticulum lectin 1	ERLEC1	-2,89	2,60E-08
protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O- methyltransferase domain containing 1	PCMTD1	-2,89	4,20E-08
Kruppel-like factor 2	KLF2	-2,89	8,19E-06
golgi SNAP receptor complex member 2	GOSR2	-2,88	1,30E-08
USO1 vesicle transport factor	USO1	-2,88	2,16E-09
metallothionein 1E	MT1E	-2,88	8,21E-10
tripartite motif containing 5	TRIM5	-2,88	2,45E-06
solute carrier family 31 (copper transporter), member 1	SLC31A1	-2,87	2,43E-10
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	ENTPD7	-2,87	3,70E-11
5-phosphohydroxy-L-lysine phospho-lyase	PHYKPL	-2,87	8,88E-05
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	MAP3K13	-2,86	8,80E-07
TatD DNase domain containing 3	TATDN3	-2,85	2,91E-09

golgin, RAB6-interacting	GORAB	-2,85	5,76E-07
acyl-CoA binding domain containing 3	ACBD3	-2,84	1,27E-10
SEC31 homolog A, COPII coat complex component	SEC31A	-2,84	4,20E-10
prolactin regulatory element binding	PREB	-2,83	4,09E-10
galactokinase 2	GALK2	-2,82	3,28E-09
butyrophilin, subfamily 3, member A3	BTN3A3	-2,82	2,43E-09
NPHP3-ACAD11 readthrough (NMD candidate)	NPHP3-ACAD11	-2,82	4,77E-08
Kruppel-like factor 6	KLF6	-2,81	8,75E-10
chromodomain helicase DNA binding protein 2; microRNA 3175	CHD2; MIR3175	-2,81	4,98E-09
Sec61 translocon alpha 1 subunit	SEC61A1	-2,81	3,07E-09
metallothionein 1L (gene/pseudogene)	MT1L	-2,81	4,57E-09
Sec23 homolog A, COPII coat complex component	SEC23A	-2,8	7,90E-11
popeye domain containing 2	POPDC2	-2,79	1,26E-06
interleukin 31 receptor A	IL31RA	-2,79	1,02E-08
Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	DNAJC10	-2,79	3,50E-11
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	TNFAIP6	-2,78	1,17E-09
XIAP associated factor 1	XAF1	-2,77	6,78E-06
transmembrane protein 71	TMEM71	-2,77	1,00E-05
WD repeat domain 19	WDR19	-2,77	9,84E-07
cerebellar degeneration related protein 2	CDR2	-2,76	1,96E-10
UFM1-specific ligase 1	UFL1	-2,76	6,99E-10
Homo sapiens uncharacterized LOC102724238 (LOC102724238), long non-coding RNA.	LOC102724238; LOC554249; RP11-111F5.4	-2,76	9,51E-06
phosphoserine aminotransferase 1	PSAT1	-2,74	1,08E-10
zinc finger and BTB domain containing 21	ZBTB21	-2,74	5,85E-10
ubiquitin-fold modifier 1	UFM1	-2,73	8,90E-10
v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	RELB	-2,73	6,07E-06
ADP-ribosylation factor like GTPase 1	ARL1	-2,73	8,58E-10
arylsulfatase D	ARSD	-2,71	3,44E-09
inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	IBTK	-2,71	5,88E-10
nudE neurodevelopment protein 1-like 1	NDEL1	-2,71	1,35E-07
uncharacterized LOC102724238; uncharacterized LOC554249	LOC102724238; LOC554249	-2,71	0,0003
zinc finger protein-like 1	ZFPL1	-2,69	6,88E-10
vesicle associated membrane protein 2	VAMP2	-2,69	3,68E-06
component of oligomeric golgi complex 1	COG1	-2,68	3,35E-06
chromosome 22 open reading frame 46	C22orf46	-2,68	6,05E-05
solute carrier family 38, member 2	SLC38A2	-2,67	3,91E-09
RAD9 checkpoint clamp component A	RAD9A	-2,67	3,80E-08
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7	SLC39A7	-2,67	1,12E-08
autophagy related 13	ATG13	-2,67	9,83E-11
macrophage stimulating 1	MST1	-2,67	1,47E-05
ADP-ribosylation factor 4	ARF4	-2,66	2,03E-11

coatomer protein complex subunit beta 1	COPB1	-2,66	6,28E-10
chromobox homolog 4	CBX4	-2,66	2,19E-10
tripartite motif containing 39	TRIM39	-2,66	3,21E-06
vascular endothelial growth factor A	VEGFA	-2,66	2,15E-10
N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 2	NDST2	-2,66	4,58E-11
calcium binding and coiled-coil domain 1	CALCOCO1	-2,65	7,30E-08
mastermind-like transcriptional coactivator 2	MAML2	-2,65	2,78E-07
trans-golgi network vesicle protein 23 homolog C (S. cerevisiae); CMT1A duplicated region transcript 4;	TVP23C; CDRT4; TVP23C-CDRT4	-2,65	9,84E-11
transmembrane p24 trafficking protein 5	TMED5	-2,64	6,45E-11
major facilitator superfamily domain containing 6	MFSD6	-2,63	4,34E-07
C-type lectin domain family 6, member A	CLEC6A	-2,63	0,0002
SIL1 nucleotide exchange factor	SIL1	-2,62	8,26E-09
spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	SAT1	-2,62	9,63E-08
tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	-2,61	1,92E-10
DENN/MADD domain containing 5A	DENND5A	-2,61	2,98E-07
serine/threonine kinase 40	STK40	-2,61	8,47E-09
N-acetylneuraminic acid synthase	NANS	-2,6	5,98E-08
junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor	JMY	-2,6	3,18E-07
butyrophilin, subfamily 3, member A2	BTN3A2	-2,6	6,39E-09
ER membrane protein complex subunit 9	EMC9	-2,6	1,03E-06
coiled-coil domain containing 167	CCDC167	-2,6	6,95E-07
chloride intracellular channel 4	CLIC4	-2,6	8,85E-09
SEC24 homolog A, COPII coat complex component	SEC24A	-2,58	1,51E-09
period circadian clock 1; microRNA 6883	PER1; MIR6883	-2,58	1,54E-05
Sec23 homolog B, COPII coat complex component	SEC23B	-2,58	2,22E-11
component of oligomeric golgi complex 3	COG3	-2,58	4,23E-09
5-azacytidine induced 2	AZI2	-2,58	1,42E-08
interferon-related developmental regulator 1	IFRD1	-2,57	6,56E-10
transmembrane protein 52B	TMEM52B	-2,57	1,78E-07
BCL2-related protein A1	BCL2A1	-2,57	1,95E-08
storkhead box 2	STOX2	-2,56	1,47E-08
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	SLC39A14	-2,56	4,88E-09
SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2	SEN2	-2,56	7,13E-08
transmembrane and coiled-coil domains 3	TMCO3	-2,56	5,05E-09
zinc finger and BTB domain containing 5	ZBTB5	-2,55	2,74E-08
trans-golgi network vesicle protein 23 homolog B (S. cerevisiae)	TVP23B	-2,55	7,01E-09
chemokine (C-X-C motif) ligand 8	CXCL8	-2,55	4,72E-08
MIS12 kinetochore complex component	MIS12	-2,55	3,02E-07
kizuna centrosomal protein	KIZ	-2,54	2,74E-07
BCL2-associated athanogene 3	BAG3	-2,54	1,39E-09
chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)	CCT6B	-2,52	0,0001

chemokine (C-C motif) receptor-like 2	CCRL2	-2,52	5,74E-07
WD repeat domain 45; PRA1 domain family, member 2	WDR45; PRAF2	-2,52	6,47E-05
phosphorylase, glycogen; brain	PYGB	-2,52	2,37E-08
CREB3 regulatory factor	CREBRF	-2,51	4,79E-05
ankyrin repeat domain 22	ANKRD22	-2,51	8,53E-08
leucine zipper transcription factor like 1	LZTFL1	-2,5	1,36E-08
steroid receptor RNA activator 1	SRA1	-2,5	2,74E-08
thioredoxin domain containing 11	TXNDC11	-2,49	3,53E-10
tetraspanin 31	TSPAN31	-2,49	3,91E-07
nitrilase 1	NIT1	-2,49	3,37E-08
solute carrier family 25, member 42	SLC25A42	-2,49	9,75E-06
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	SLC2A3	-2,49	6,40E-10
THAP9 antisense RNA 1	THAP9-AS1	-2,47	1,17E-09
mediator complex subunit 8	MED8	-2,46	5,19E-10
N-acetylglucosamine kinase	NAGK	-2,46	4,24E-09
zinc finger protein 773	ZNF773	-2,46	3,67E-08
chloride channel, voltage-sensitive 3	CLCN3	-2,45	3,88E-09
Memczak2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, UTR3 best transcript NM_001001349	NKIRAS2	-2,44	0,0057
Jeck2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEXON best transcript NM_001042476	CARHSP1	-2,44	6,14E-06
von Willebrand factor A domain containing 5A	VWA5A	-2,44	5,56E-06
zinc finger protein 697	ZNF697	-2,43	0,0002
Yip1 domain family member 5	YIPF5	-2,43	5,58E-10
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	NFKBIZ	-2,43	1,22E-06
centrosomal protein 120kDa	CEP120	-2,43	6,20E-08
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14	SLC2A14	-2,42	6,46E-09
microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta 2	MAP1LC3B2	-2,42	5,70E-06
intraflagellar transport 20	IFT20	-2,41	9,47E-08
zinc finger, MYND-type containing 12	ZMYND12	-2,4	5,16E-05
WD repeat domain 5B	WDR5B	-2,4	5,07E-06
Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_003574	VAPA	-2,4	8,61E-06
dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 4	DYRK4	-2,4	3,75E-07
tribbles pseudokinase 1	TRIB1	-2,4	7,86E-07
metallothionein 1X	MT1X	-2,39	3,72E-09
chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3	-2,39	0,0002
ring finger protein 19B	RNF19B	-2,39	2,80E-08
translocation associated membrane protein 1	TRAM1	-2,39	3,29E-10
tripartite motif containing 34	TRIM34	-2,38	1,55E-05
zinc finger protein 587	ZNF587	-2,38	2,08E-07

golgi transport 1B	GOLT1B	-2,38	4,19E-07
SEC11 homolog C, signal peptidase complex subunit	SEC11C	-2,38	2,29E-08
seryl-tRNA synthetase	SARS	-2,38	1,68E-09
UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	UAP1	-2,38	2,10E-08
RNA binding motif protein 11	RBM11	-2,38	3,97E-07
decapping exoribonuclease	DXO	-2,38	8,18E-06
zinc finger protein 417	ZNF417	-2,37	4,12E-08
zinc finger protein 75D	ZNF75D	-2,37	6,13E-07
DAZ interacting zinc finger protein 3	DZIP3	-2,37	3,37E-07
Sec61 translocon beta subunit	SEC61B	-2,37	1,05E-07
transducin (beta)-like 2	TBL2	-2,36	2,79E-08
golgi reassembly stacking protein 2	GORASP2	-2,36	1,05E-08
Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_017841	SDHAF2	-2,35	0,0002
MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	MKMK2	-2,35	1,10E-08
homeobox containing 1	HMBOX1	-2,35	1,88E-06
jagged 1	JAG1	-2,35	0,0002
tripartite motif containing 25; microRNA 3614	TRIM25; MIR3614	-2,35	3,06E-08
schlafen family member 5	SLFN5	-2,34	9,09E-05
magnesium transporter 1	MAGT1	-2,33	5,91E-10
synaptotagmin like 1	SYTL1	-2,32	8,70E-07
chromosome 7 open reading frame 31	C7orf31	-2,31	8,62E-07
complement component 5a receptor 1	C5AR1	-2,31	1,49E-06
NUS1 dehydrodolichyl diphosphate synthase subunit	NUS1	-2,31	3,13E-09
neuropilin 1	NRP1	-2,31	8,10E-08
F-box and leucine-rich repeat protein 13	FBXL13	-2,3	5,09E-06
coatamer protein complex subunit alpha	COPA	-2,3	1,67E-08
dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	DAPP1	-2,29	2,39E-07
AT-hook transcription factor	AKNA	-2,29	0,0027
golgin A3	GOLGA3	-2,29	8,72E-06
Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_015049	TRAK2	-2,29	4,02E-05
StAR-related lipid transfer domain containing 4	STARD4	-2,29	1,36E-07
oxysterol binding protein-like 2	OSBPL2	-2,29	1,61E-08
adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	AP3D1	-2,29	3,73E-07
thioredoxin domain containing 15	TXNDC15	-2,29	4,17E-07
cysteinyl-tRNA synthetase	CARS	-2,28	3,38E-09
ring finger protein 185	RNF185	-2,28	1,07E-07
histone cluster 2, H2ab	HIST2H2AB	-2,28	7,90E-08
FOS-like antigen 2	FOSL2	-2,28	2,09E-05
transmembrane protein 143	TMEM143	-2,27	0,0014
GRB2-associated binding protein 2	GAB2	-2,27	0,0004
tripartite motif containing 16-like	TRIM16L	-2,27	3,32E-05

NECAP endocytosis associated 1	NECAP1	-2,27	8,69E-08
TATA element modulatory factor 1	TMF1	-2,27	2,82E-07
BSD domain containing 1	BSDC1	-2,27	3,11E-07
KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	KDELR2	-2,26	1,75E-09
family with sequence similarity 114, member A1	FAM114A1	-2,26	9,52E-08
store-operated calcium entry-associated regulatory factor	SARAF	-2,26	3,19E-07
siah E3 ubiquitin protein ligase 2	SIAH2	-2,26	1,01E-09
small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, beta	SGTB	-2,26	1,12E-07
CDK5 regulatory subunit associated protein 3	CDK5RAP3	-2,26	1,74E-07
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C , member 25	DNAJC25	-2,25	1,92E-08
glutaminyl-peptide cyclotransferase-like	QPCTL	-2,25	1,65E-06
kelch domain containing 2	KLHDC2	-2,25	2,56E-09
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	ATP2B1	-2,25	6,20E-07
Ras homolog enriched in brain like 1	RHEBL1	-2,25	0,0026
calumenin	CALU	-2,25	1,56E-09
serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3; C8orf44-SGK3 readthrough	SGK3; C8orf44-SGK3	-2,24	2,90E-07
solute carrier family 35, member E1	SLC35E1	-2,24	2,58E-08
zinc finger, CW type with PWWP domain 2	ZCWPW2	-2,24	6,01E-06
golgin A8 family, member N	GOLGA8N	-2,24	9,45E-06
listerin E3 ubiquitin protein ligase 1	LTN1	-2,24	5,20E-08
progesterin and adipoQ receptor family member VI	PAQR6	-2,24	0,0021
ISL LIM homeobox 2	ISL2	-2,23	8,94E-09
protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	PTPRE	-2,23	2,64E-08
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	CEBPG	-2,23	1,01E-08
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	-2,23	0,0004
schlafen family member 11	SLFN11	-2,22	1,17E-08
family with sequence similarity 157, member B	FAM157B	-2,22	0,0001
methylmalonyl CoA epimerase	MCEE	-2,22	1,57E-07
cytohesin 2	CYTH2	-2,22	1,37E-08
Yip1 domain family member 2	YIPF2	-2,22	5,58E-07
MDM4, p53 regulator	MDM4	-2,21	1,23E-07
GDNF-inducible zinc finger protein 1	GZF1	-2,21	1,42E-08
neighbor of BRCA1 gene 1	NBR1	-2,21	2,75E-06
K(lysine) acetyltransferase 6B	KAT6B	-2,21	4,43E-06
transmembrane protein 45A	TMEM45A	-2,2	2,49E-06
RecQ helicase-like 5	RECQL5	-2,2	1,01E-06
basic leucine zipper nuclear factor 1	BLZF1	-2,2	5,37E-06
immediate early response 3	IER3	-2,2	9,52E-06
Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 8565	YARS	-2,2	0,0009
GRIP and coiled-coil domain containing 2	GCC2	-2,2	6,07E-07
phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha	PI4K2A	-2,2	2,76E-07
apertaxin and PNKP like factor	APLF	-2,2	2,18E-06

FK506 binding protein 2	FKBP2	-2,2	2,99E-08
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-2,19	1,35E-06
RAB8B, member RAS oncogene family	RAB8B	-2,19	2,86E-08
TBC1 domain family, member 10A	TBC1D10A	-2,19	0,0002
SEC16 homolog A, endoplasmic reticulum export factor	SEC16A	-2,19	4,23E-06
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	DNAJB4	-2,18	8,94E-07
HERV-H LTR-associating 3	HHLA3	-2,18	5,70E-06
CDGSH iron sulfur domain 2	CISD2	-2,17	1,26E-08
Mdm1 nuclear protein	MDM1	-2,17	4,61E-06
sarcoglycan gamma	SGCG	-2,17	3,29E-05
carbonic anhydrase VB, mitochondrial	CA5B	-2,17	2,46E-05
cullin 7	CUL7	-2,17	6,49E-07
zinc finger, C2HC-type containing 1A	ZC2HC1A	-2,17	4,24E-07
pentraxin 3, long	PTX3	-2,17	4,21E-07
RAB2B, member RAS oncogene family	RAB2B	-2,16	1,62E-08
SEC13 homolog, nuclear pore and COPII coat complex component	SEC13	-2,16	4,49E-07
tuftelin 1	TUFT1	-2,15	2,82E-06
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	-2,15	0,0002
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa	POLR3D	-2,15	4,33E-07
GRIP and coiled-coil domain containing 1	GCC1	-2,15	1,23E-05
TRK-fused gene	TFG	-2,15	2,64E-09
HCLS1 associated protein X-1	HAX1	-2,15	1,91E-07
golgin A4	GOLGA4	-2,15	4,83E-07
Kruppel-like factor 10	KLF10	-2,14	7,62E-09
zinc finger protein 596	ZNF596	-2,14	4,15E-05
chromosome 2 open reading frame 74	C2orf74	-2,14	1,68E-06
coenzyme Q10B	COQ10B	-2,14	6,91E-08
SEC22 homolog B, vesicle trafficking protein (gene/pseudogene)	SEC22B	-2,14	4,86E-09
ALG2, alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase	ALG2	-2,14	2,02E-08
potassium channel tetramerization domain containing 21	KCTD21	-2,14	0,0002
programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); microRNA 4680	PDCD4; MIR4680	-2,13	2,27E-08
SPRY domain containing 3	SPRYD3	-2,13	6,32E-05
potassium channel, two pore domain subfamily K, member 6	KCNK6	-2,13	7,20E-07
ArfGAP with FG repeats 2	AGFG2	-2,13	8,53E-07
derlin 3	DERL3	-2,13	1,50E-08
zinc finger protein 526	ZNF526	-2,13	1,13E-07
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	-2,13	8,88E-08
PAN2 poly(A) specific ribonuclease subunit; canopy	PAN2; CNPY2	-2,12	1,34E-07
FGF signaling regulator 2			
interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	-2,12	0,0013

ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	ATP2A2	-2,12	7,76E-09
caspase 7	CASP7	-2,12	1,14E-05
UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	UGCG	-2,11	3,15E-06
mex-3 RNA binding family member C	MEX3C	-2,11	2,62E-08
coiled-coil domain containing 134	CCDC134	-2,11	4,31E-05
caspase 10	CASP10	-2,11	1,09E-07
ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4	ST6GALNAC4	-2,11	4,14E-07
surfeit 4	SURF4	-2,1	4,59E-05
melanoma inhibitory activity family, member 3	MIA3	-2,1	1,49E-08
TBC1 domain family, member 16	TBC1D16	-2,1	2,16E-06
FK506 binding protein 11; ADP-ribosylation factor 3 neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	FKBP11; ARF3	-2,1	3,39E-07
DNA-damage regulated autophagy modulator 1	NEDD9	-2,1	6,22E-07
glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	DRAM1	-2,1	0,0079
protein disulfide isomerase family A, member 6	GPT2	-2,09	3,12E-06
pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2	PDIA6	-2,09	6,90E-09
aspartylglucosaminidase	PELI2	-2,09	7,20E-06
TDP-glucose 4,6-dehydratase	AGA	-2,09	7,04E-08
kelch-like family member 28	TGDS	-2,09	1,77E-08
Sec61 translocon gamma subunit	KLHL28	-2,08	1,70E-06
multiple coagulation factor deficiency 2	SEC61G	-2,08	2,25E-08
activin A receptor type I	MCFD2	-2,08	1,97E-08
aldo-keto reductase family 1, member C1	ACVR1	-2,08	1,62E-05
tripartite motif containing 4	AKR1C1	-2,08	0,0024
Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 7227	TRIM4	-2,08	1,46E-07
oleoyl-ACP hydrolase	TRPS1	-2,08	0,0411
LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 4	OLAH	-2,07	0,0015
dual specificity phosphatase 16	LYSMD4	-2,07	2,02E-05
complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)	DUSP16	-2,07	2,79E-05
defensin, beta 104A; defensin, beta 104B	CR1	-2,07	1,52E-08
tubby like protein 3	DEFB104A; DEFB104B	-2,07	0,001
motile sperm domain containing 1	TULP3	-2,07	2,09E-07
Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 8829	MOSPD1	-2,07	1,39E-06
F-box protein 32	NRP1	-2,06	0,0005
interleukin 18	FBXO32	-2,06	0,0184
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class P	IL18	-2,06	1,20E-05
pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PIGP	-2,05	2,40E-07
	PHLDA1	-2,05	1,54E-06

bora, aurora kinase A activator	BORA	-2,05	1,97E-07
golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1	GBF1	-2,05	7,40E-09
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E2	ATP6V1E2	-2,05	1,44E-05
leukocyte receptor cluster (LRC) member 8	LENG8	-2,05	5,98E-06
signal recognition particle 19kDa; zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 1	SRP19; ZRSR1	-2,05	1,78E-05
chromosome 16 open reading frame 58	C16orf58	-2,05	1,00E-07
coenzyme Q4	COQ4	-2,05	1,81E-05
golgin A6 family-like 5, pseudogene; golgin A6 family-like 17, pseudogene	GOLGA6L5P; GOLGA6L17P	-2,05	2,52E-05
ubiquitin specific peptidase 53	USP53	-2,05	1,56E-06
zinc finger, FYVE domain containing 16	ZFYVE16	-2,05	6,53E-07
pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1	PDXDC1	-2,05	9,27E-06
cAMP responsive element binding protein 3-like 4	CREB3L4	-2,05	1,64E-05
SCY1-like, kinase-like 1	SCYL1	-2,05	6,74E-07
phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	-2,04	1,21E-08
tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	TNKS	-2,04	1,28E-06
ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1; microRNA 4326	ARFGAP1; MIR4326	-2,03	1,59E-08
lymphocyte antigen 96	LY96	-2,03	0,0015
zinc finger protein 678	ZNF678	-2,03	2,89E-06
THAP domain containing 5	THAP5	-2,03	3,51E-06
metallothionein 1I, pseudogene	MT1IP	-2,03	1,38E-06
Jeck2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEXON, UTR3 best transcript NM_003542	HIST1H4C	-2,03	0,0004
CCR4-NOT transcription complex subunit 3	CNOT3	-2,03	3,44E-06
CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	CD55	-2,02	3,66E-08
Memczak2013 ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_198268	HIPK1	-2,02	0,0041
prolyl endopeptidase-like	PREPL	-2,02	8,58E-09
activating transcription factor 4	ATF4	-2,02	2,77E-08
CASK interacting protein 1	CASKIN1	-2,02	4,09E-05
transmembrane anterior posterior transformation 1	TAPT1	-2,02	1,19E-07
de-etiolated homolog 1 (Arabidopsis)	DET1	-2,02	8,22E-06
solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 2	SLC3A2	-2,01	2,66E-09
tropomodulin 2 (neuronal)	TMOD2	-2,01	1,33E-05
Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae)	YIF1A	-2,01	8,89E-07
oligosaccharyltransferase complex subunit (non-catalytic)	OSTC	-2,01	2,76E-07
growth factor receptor bound protein 10	GRB10	-2,01	2,61E-08
TRIM39-RPP21 readthrough	TRIM39-RPP21	-2,01	0,0011

UFM1-specific peptidase 2	UFSP2	-2,01	6,08E-09
motile sperm domain containing 2	MOSPD2	-2,01	4,03E-06
dehydrodolichyl diphosphate synthase subunit	DHDDS	-2	2,22E-07
SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2	SOS2	-2	1,88E-05
coatamer protein complex subunit beta 2 (beta prime)	COPB2	-2	2,47E-08
jun D proto-oncogene	JUND	-2	7,29E-06
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2	NDUFA4L2	-2	0,0008

GENES CUYA EXPRESIÓN AUMENTA TRAS EL TRATAMIENTO CON WIN-55			
Nombre de la proteína	Nombre del gen	Fold change	p-Val
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	SNRPG	2	4,03E-05
carbonic anhydrase II	CA2	2	1,23E-05
fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	FUT7	2	4,21E-05
galactosidase, alpha	GLA	2	4,76E-06
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	SLC25A23	2,01	0,0005
retinoic acid receptor, alpha	RARA	2,01	3,49E-07
euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	EHMT2	2,01	0,0003
elaC ribonuclease Z 2	ELAC2	2,01	4,14E-06
pantothenate kinase 1	PANK1	2,01	4,67E-05
aspartyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	DARS2	2,01	5,05E-07
etoposide induced 2.4	EI24	2,01	4,07E-08
synaptogyrin 1	SYNGR1	2,01	2,15E-05
importin 13	IPO13	2,01	6,76E-06
angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	AGT	2,02	6,11E-05
tubulin, delta 1	TUBD1	2,02	3,47E-06
fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	2,02	6,38E-07
inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	ITPK1	2,02	8,50E-07
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	SERPINB10	2,02	5,29E-08
GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	GINS1	2,02	1,78E-07
solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 3; microRNA 6787	SLC16A3; MIR6787	2,02	5,08E-06
fatty acid desaturase 2	FADS2	2,02	1,50E-07
PWP2 periodic tryptophan protein homolog (yeast)	PWP2	2,02	1,18E-05
chromosome 10 open reading frame 91	C10orf91	2,02	0,0017
LIM domain binding 1	LDB1	2,02	9,35E-07
kelch-like ECH-associated protein 1	KEAP1	2,02	4,52E-07
SMAD family member 1	SMAD1	2,03	1,14E-05
patched 1	PTCH1	2,03	1,75E-05
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	ATP6V1C2	2,03	7,60E-07
zinc finger, CCHC domain containing 11	ZCCHC11	2,03	0,0004
upregulator of cell proliferation; URGCP-MRPS24 readthrough	URGCP; URGCP- MRPS24	2,03	2,49E-05
sirtuin 7	SIRT7	2,03	0,0003
scaffold attachment factor B	SAFB	2,03	1,18E-07
proteasome 26S subunit, non-ATPase 11	PSMD11	2,03	3,69E-08
sine oculis binding protein homolog	SOBP	2,04	0,0003
THAP domain containing 11	THAP11	2,04	3,60E-07
nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing	NACC1	2,04	5,50E-09
leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	LARS2	2,04	3,85E-05
solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol	SLC5A3; MRPS6	2,04	2,00E-07

cotransporter), member 3; mitochondrial ribosomal protein S6			
SIX homeobox 1	SIX1	2,04	1,58E-05
methionine sulfoxide reductase B3	MSRB3	2,04	1,02E-05
transmembrane protein 164	TMEM164	2,04	2,38E-05
3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	HACD3	2,04	2,15E-07
sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats containing	SORL1	2,05	3,76E-05
GIN5 complex subunit 2 (Psf2 homolog)	GIN52	2,05	1,43E-06
peroxisomal membrane protein 2	PXMP2	2,05	4,60E-07
KIAA2013	KIAA2013	2,05	8,70E-05
bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	2,05	3,41E-06
discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	DCBLD2	2,05	9,35E-09
rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	RABEP1	2,05	6,64E-07
cell division cycle 14A	CDC14A	2,05	4,22E-08
myelin protein zero-like 1	MPZL1	2,05	6,65E-06
nudix hydrolase 5	NUDT5	2,05	4,95E-05
potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 15	KCNJ15	2,05	5,41E-05
megakaryocyte-associated tyrosine kinase	MATK	2,05	0,0002
methyltransferase like 7A	METTL7A	2,06	3,04E-05
MRT4 homolog, ribosome maturation factor	MRTO4	2,06	8,45E-08
zinc finger and BTB domain containing 16	ZBTB16	2,06	2,44E-05
WD repeat domain 77	WDR77	2,06	7,59E-08
protein phosphatase 1, regulatory subunit 27	PPP1R27	2,06	1,11E-07
vesicular, overexpressed in cancer, prosurvival protein 1	VOPP1	2,06	4,15E-05
coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4	CHCHD4	2,07	4,50E-07
SH3-domain binding protein 1; pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	SH3BP1; PDXP	2,07	3,15E-05
fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	FUT8	2,07	2,54E-06
solute carrier family 25, member 43	SLC25A43	2,07	5,42E-06
cyclin A1	CCNA1	2,07	2,88E-07
carbonyl reductase 1	CBR1	2,07	1,08E-07
tescalcin	TESC	2,07	3,96E-05
phosphoglycerate mutase 1 (brain)	PGAM1	2,07	3,02E-07
zinc finger protein 114	ZNF114	2,08	4,44E-05
solute carrier family 8 (sodium/lithium/calcium exchanger), member B1	SLC8B1	2,08	2,72E-07
C-type lectin domain family 11, member A	CLEC11A	2,08	9,85E-06
amylase, alpha 1A (salivary); amylase, alpha 1C (salivary)	AMY1A; AMY1C	2,08	0,0052
jade family PHD finger 3	JADE3	2,08	0,0001
neuron-derived neurotrophic factor	NDNF	2,08	2,57E-05
ceramide kinase	CERK	2,08	8,31E-07
plexin B2	PLXNB2	2,09	0,0003

SMAD family member 7	SMAD7	2,09	1,96E-06
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	MS4A4A	2,09	9,19E-06
IQ motif containing GTPase activating protein 2	IQGAP2	2,09	3,32E-08
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	NR2F6	2,09	8,87E-06
CDGSH iron sulfur domain 3	CISD3	2,09	6,64E-05
nucleoporin 85kDa	NUP85	2,09	3,71E-07
PWP2 periodic tryptophan protein homolog (yeast)	PWP2	2,09	5,02E-08
coiled-coil domain containing 109B	CCDC109B	2,09	6,18E-05
upregulator of cell proliferation	URGCP	2,1	9,53E-07
WW and C2 domain containing 1	WWC1	2,1	6,46E-06
stimulated by retinoic acid 13	STRA13	2,1	0,0001
chromosome 5 open reading frame 30	C5orf30	2,11	0,0001
zinc finger, DHHC-type containing 14	ZDHHC14	2,11	9,85E-06
centromere protein V	CENPV	2,11	4,83E-05
upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	UBTF	2,12	1,17E-08
RNA methyltransferase like 1	RNMTL1	2,12	0,0005
integrin beta 1 binding protein 1	ITGB1BP1	2,12	1,64E-07
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5	AGPAT5	2,12	3,30E-07
thymidylate synthetase	TYMS	2,12	3,07E-08
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	HMGCS1	2,12	6,56E-06
RNA pseudouridylate synthase domain containing 1	RPUSD1	2,13	6,10E-07
MyoD family inhibitor domain containing	MDFIC	2,13	2,18E-08
regulator of chromosome condensation 2	RCC2	2,13	1,59E-08
mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase	MGAT5	2,13	3,51E-08
copine II	CPNE2	2,14	6,82E-05
retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	RDH10	2,14	3,01E-07
ribosome biogenesis regulator homolog	RRS1	2,14	2,36E-06
LDL receptor related protein 8	LRP8	2,14	6,07E-07
sialophorin	SPN	2,15	2,45E-08
PGAM family member 5, serine/threonine protein phosphatase, mitochondrial	PGAM5	2,15	9,95E-06
myosin regulatory light chain interacting protein; microRNA 4639	MYLIP; MIR4639	2,15	4,09E-06
GRAM domain containing 1B	GRAMD1B	2,15	7,07E-07
cysteine and histidine rich domain containing 1	CHORDC1	2,15	2,68E-08
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2	PHLPP2	2,15	0,0021
ubiquitin-like 4A	UBL4A	2,15	4,04E-05
hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	HGF	2,15	6,19E-08
uncharacterized protein MGC27345	MGC27345	2,15	1,61E-05
RAS protein activator like 2	RASAL2	2,15	3,46E-05
colony stimulating factor 1 receptor	CSF1R	2,16	0,0022

ubiquitin conjugating enzyme E2G 1	UBE2G1	2,16	1,50E-07
DEP domain containing 7	DEPDC7	2,16	5,26E-07
ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)	UBR7	2,16	5,63E-06
paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia; microRNA 6810	PNKD; MIR6810	2,16	3,51E-06
helicase, lymphoid-specific	HELLS	2,17	2,06E-05
choroideremia-like (Rab escort protein 2)	CHML	2,17	8,35E-06
claspin	CLSPN	2,17	3,68E-07
DIS3 like exosome 3-5 exoribonuclease	DIS3L	2,17	2,16E-08
lymphoblastic leukemia associated hematopoiesis regulator 1	LYL1	2,17	2,22E-08
transforming growth factor beta 1	TGFB1	2,18	5,86E-06
nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	NFIC	2,18	3,08E-06
spermatogenesis associated, serine-rich 2	SPATS2	2,18	7,56E-05
solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	SLC20A1	2,18	6,39E-09
ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28	2,19	0,0007
G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1	GIT1	2,19	2,99E-08
zinc and ring finger 3	ZNRF3	2,19	1,53E-06
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	PTPN6	2,19	1,35E-06
gem nuclear organelle associated protein 4	GEMIN4	2,19	0,0006
diacylglycerol O-acyltransferase 2	DGAT2	2,19	1,41E-07
fermitin family member 1	FERMT1	2,19	1,77E-08
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39A	DDX39A	2,19	1,71E-07
peptidase (mitochondrial processing) alpha	PMPCA	2,19	3,25E-06
scavenger receptor class B, member 1	SCARB1	2,2	1,48E-07
F-box and leucine-rich repeat protein 19	FBXL19	2,2	8,22E-07
jade family PHD finger 2	JADE2	2,2	4,87E-06
coronin, actin binding protein, 2A	CORO2A	2,2	6,53E-08
solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	SLC27A2	2,21	2,78E-07
DENN/MADD domain containing 1B	DENND1B	2,21	8,96E-06
abhydrolase domain containing 14A	ABHD14A	2,21	0,0062
leucine rich repeat containing 8 family, member C	LRRC8C	2,21	6,85E-07
fms-related tyrosine kinase 3	FLT3	2,21	1,14E-05
sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)	SPR	2,21	4,28E-07
cytokine induced apoptosis inhibitor 1	CIAPIN1	2,22	3,27E-07
opioid growth factor receptor	OGFR	2,22	9,18E-07
family with sequence similarity 117, member A	FAM117A	2,22	6,15E-05
7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7	2,22	3,17E-07
docking protein 3	DOK3	2,22	0,0001
adaptor-related protein complex 1 sigma 3 subunit	AP1S3	2,22	0,0002
cullin 1	CUL1	2,23	1,20E-08
fatty acid desaturase 1; microRNA 1908	FADS1; MIR1908	2,24	2,35E-08

immunoglobulin superfamily, member 10	IGSF10	2,24	1,61E-05
solute carrier family 5 (sodium/multivitamin and iodide cotransporter), member 6	SLC5A6	2,24	6,57E-07
Src-like-adaptor	SLA	2,24	1,18E-06
megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	MLC1	2,24	1,09E-05
FOS-like antigen 1	FOSL1	2,25	2,17E-05
prenylcysteine oxidase 1	PCYOX1	2,25	2,76E-07
transmembrane protein 64	TMEM64	2,25	1,81E-05
tensin 3	TNS3	2,25	0,0001
caspase 2	CASP2	2,25	4,03E-09
clathrin, heavy chain-like 1	CLTCL1	2,25	8,81E-08
docking protein 2	DOK2	2,25	1,89E-07
ribosomal RNA processing 36	RRP36	2,25	2,27E-05
deoxycytidine kinase	DCK	2,25	7,15E-09
arylsulfatase B	ARSB	2,26	1,14E-08
lysophosphatidic acid receptor 4	LPAR4	2,26	4,98E-06
active BCR-related	ABR	2,26	2,43E-05
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	SLC39A10	2,26	1,33E-06
LIM domains containing 1	LIMD1	2,26	0,0003
heat shock 10kDa protein 1	HSPE1	2,26	1,57E-07
FAST kinase domains 1	FASTKD1	2,27	1,09E-06
neurotensin receptor 1 (high affinity)	NTSR1	2,27	3,32E-05
leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	LETM1	2,27	1,19E-07
mitochondrial ribosomal protein S12	MRPS12	2,27	3,80E-06
family with sequence similarity 216, member A	FAM216A	2,27	4,37E-08
methionine adenosyltransferase II, alpha	MAT2A	2,27	8,73E-10
polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit	POLE2	2,28	6,00E-05
signal-regulatory protein beta 1	SIRPB1	2,28	4,00E-06
FK506 binding protein 4	FKBP4	2,28	4,40E-08
protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B	PPP1R9B	2,28	1,94E-05
phosphodiesterase 4A, cAMP-specific	PDE4A	2,28	4,06E-06
chromosome 1 open reading frame 106	C1orf106	2,29	5,58E-06
AhpC/TSA antioxidant enzyme domain containing 1	AAED1	2,29	5,30E-07
DEF6 guanine nucleotide exchange factor	DEF6	2,29	0,0001
chromosome 20 open reading frame 27	C20orf27	2,29	9,34E-06
solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	SLCO3A1	2,29	5,70E-06
NEDD4 binding protein 2-like 1	N4BP2L1	2,29	2,87E-05
ubiquitin conjugating enzyme E2N	UBE2N	2,3	1,62E-08
caspase 6	CASP6	2,3	0,0017
S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase	SKP2	2,3	3,42E-10
teashirt zinc finger homeobox 1	TSHZ1	2,31	1,85E-06
EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine	EOGT	2,31	3,60E-06

(GlcNAc) transferase			
cyclin-dependent kinase 15	CDK15	2,31	0,0001
acid sensing ion channel 1	ASIC1	2,31	0,0008
lysine (K)-specific demethylase 2B	KDM2B	2,31	1,38E-07
protein kinase C, delta	PRKCD	2,32	1,01E-07
high mobility group box 3	HMGB3	2,32	3,63E-08
cell death-inducing DFFA-like effector b	CIDEB	2,32	3,21E-05
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	AGPAT2	2,33	1,17E-05
mediator complex subunit 31	MED31	2,33	2,84E-05
SAM domain and HD domain 1	SAMHD1	2,33	6,81E-08
Ets2 repressor factor	ERF	2,34	3,36E-09
endonuclease G	ENDOG	2,34	1,57E-06
phosphoglycerate mutase family member 4	PGAM4	2,34	0,0001
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase	MAP3K1	2,35	7,55E-06
N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 2 (putative)	N6AMT2	2,35	2,80E-07
family with sequence similarity 212, member A	FAM212A	2,35	5,97E-06
Scm-like with four mbt domains 1	SFMBT1	2,35	3,54E-06
placenta specific 8	PLAC8	2,36	1,89E-08
tripartite motif containing 13; potassium channel regulator	TRIM13; KCNRG	2,36	3,04E-09
isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	IDI1	2,38	2,24E-06
zinc finger and BTB domain containing 7B	ZBTB7B	2,38	1,08E-06
solute carrier family 19 (folate transporter), member 1	SLC19A1	2,38	1,39E-09
tubulin, gamma complex associated protein 4	TUBGCP4	2,39	5,75E-08
microRNA 6809; tensin 1	MIR6809; TNS1	2,39	1,46E-07
ELOVL fatty acid elongase 6	ELOVL6	2,39	4,31E-08
chromosome X open reading frame 21	CXorf21	2,39	2,19E-09
A kinase (PRKA) anchor protein 1	AKAP1	2,39	7,00E-09
tetraspanin 14	TSPAN14	2,4	2,56E-08
PR domain containing 1, with ZNF domain	PRDM1	2,4	8,42E-06
fatty acyl-CoA reductase 2	FAR2	2,4	1,34E-07
paraoxonase 2	PON2	2,4	2,26E-08
regulator of chromosome condensation 2	RCC2	2,4	2,94E-08
chromosome 2 open reading frame 44	C2orf44	2,41	9,48E-07
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	2,41	2,34E-05
mevalonate kinase	MVK	2,41	0,0009
endoglin	ENG	2,41	1,56E-06
DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)	DFFB	2,42	6,72E-07
gem nuclear organelle associated protein 5	GEMIN5	2,42	1,50E-09
phosphofructokinase, platelet	PFKP	2,43	1,38E-08
ankyrin repeat domain 16	ANKRD16	2,43	4,91E-05
G protein-coupled receptor 141	GPR141	2,44	1,25E-05
uridine-cytidine kinase 2; microRNA 3658	UCK2; MIR3658	2,44	1,33E-08

membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	MS4A6A	2,45	9,33E-09
male-specific lethal 1 homolog (Drosophila)	MSL1	2,46	2,48E-07
glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	GCNT1	2,47	6,90E-08
basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	BATF	2,47	2,42E-05
peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	PPARGC1B	2,48	6,73E-06
Gse1 coiled-coil protein	GSE1	2,49	0,0001
phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	PIK3R3	2,49	1,73E-07
amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein	APBB1IP	2,49	9,11E-08
vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	VDR	2,49	5,81E-08
RAB7B, member RAS oncogene family	RAB7B	2,49	3,65E-06
ubiquilin 4	UBQLN4	2,49	7,30E-09
transcriptional regulating factor 1	TRERF1	2,5	4,80E-07
PQ loop repeat containing 2	PQLC2	2,5	3,90E-06
sterile alpha motif domain containing 1	SAMD1	2,51	2,05E-06
cyclin E1	CCNE1	2,51	6,89E-07
leucine rich repeat containing 34	LRRC34	2,52	1,84E-08
neuronal regeneration related protein	NREP	2,52	7,14E-08
transmembrane protein 201	TMEM201	2,53	2,81E-08
peripheral myelin protein 22	PMP22	2,53	1,50E-05
small nuclear ribonucleoprotein, U11/U12 25kDa subunit	SNRNP25	2,53	2,45E-06
bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	BAZ1A	2,54	8,65E-10
TAR DNA binding protein	TARDBP	2,54	4,75E-10
A kinase (PRKA) anchor protein 2	AKAP2	2,55	1,04E-07
chromosome 6 open reading frame 136	C6orf136	2,55	3,96E-07
zinc finger and BTB domain containing 12	ZBTB12	2,55	3,17E-05
regulator of chromosome condensation 1; small nucleolar RNA, H/ACA box 73A;	RCC1; SNORA73A; SNHG3; SNORA73B	2,55	9,72E-09
insulin induced gene 1	INSIG1	2,56	4,82E-08
ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)	CHAC2	2,56	1,61E-06
absent in melanoma 1	AIM1	2,57	5,64E-08
RNA binding motif protein 38	RBM38	2,57	2,77E-10
proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	PRRG4	2,57	8,99E-06
nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	NFIX	2,57	1,26E-06
kelch-like family member 23	KLHL23	2,57	0,0022
oxysterol binding protein-like 3	OSBPL3	2,58	1,12E-06
phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	PIK3AP1	2,58	1,04E-07
potassium channel tetramerization domain containing 15	KCTD15	2,59	1,06E-05
vav 1 guanine nucleotide exchange factor	VAV1	2,59	7,76E-08

progesterin and adipoQ receptor family member IV	PAQR4	2,59	4,70E-05
ATP binding cassette subfamily B member 10	ABCB10	2,59	9,28E-10
prostaglandin E receptor 2	PTGER2	2,6	1,92E-08
semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)	SEMA7A	2,62	1,68E-05
septin 3	sep-03	2,62	1,98E-06
glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	GATM	2,62	1,14E-08
neurolysin (metallopeptidase M3 family)	NLN	2,62	1,04E-07
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	2,63	1,64E-05
Charcot-Leyden crystal galectin	CLC	2,63	2,48E-07
SET domain and mariner transposase fusion gene	SETMAR	2,64	1,25E-07
dCTP pyrophosphatase 1	DCTPP1	2,64	3,93E-09
synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	SSX2IP	2,64	2,94E-05
prokineticin 2	PROK2	2,65	1,01E-08
XRCC6 binding protein 1	XRCC6BP1	2,65	3,11E-09
ALS2, alsin Rho guanine nucleotide exchange factor	ALS2	2,66	1,02E-09
SET-like protein	SETSIP	2,67	9,91E-06
POP1 homolog, ribonuclease P/MRP subunit	POP1	2,68	5,77E-08
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class B	PIGB	2,69	1,56E-08
solute carrier family 25 (mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier), member 19	SLC25A19	2,69	1,27E-08
cell division cycle 7	CDC7	2,69	9,12E-08
adhesion G protein-coupled receptor A3	ADGRA3	2,7	3,01E-06
F-box protein 43	FBXO43	2,72	3,50E-05
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	NFATC2	2,72	7,58E-09
pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	P2RY6	2,73	9,66E-08
chromobox homolog 6	CBX6	2,73	1,53E-07
GRAM domain containing 4	GRAMD4	2,73	1,41E-09
mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A	MGAT4A	2,73	4,03E-08
ZFP36 ring finger protein-like 2	ZFP36L2	2,74	2,98E-09
dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2	DKK2	2,75	6,83E-08
family with sequence similarity 136, member A	FAM136A	2,75	3,48E-06
NOP16 nucleolar protein	NOP16	2,76	1,47E-08
cytokine inducible SH2-containing protein	CISH	2,77	1,21E-08
B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	BCL11A	2,8	1,17E-06
heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	HS3ST3A1	2,8	1,16E-08
uracil DNA glycosylase	UNG	2,81	5,53E-08
acetyl-CoA acetyltransferase 2	ACAT2	2,82	3,96E-10
SMAD family member 6	SMAD6	2,82	1,64E-06
aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	ALDH1B1	2,85	4,04E-09
selectin P ligand	SELPLG	2,87	4,18E-08

solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22	SLC25A22	2,88	2,59E-07
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	ATP2B4	2,88	5,49E-06
glycosyltransferase 1 domain containing 1	GLT1D1	2,89	1,23E-08
NACC family member 2, BEN and BTB (POZ) domain containing	NACC2	2,9	7,25E-08
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	PTPN7	2,9	8,71E-09
sestrin 3	SESN3	2,91	1,03E-08
myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA	2,92	2,31E-10
cholinergic receptor, nicotinic alpha 5	CHRNA5	2,94	1,98E-08
integrin alpha 5	ITGA5	2,95	2,85E-09
G protein-coupled receptor 18	GPR18	2,96	5,12E-09
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like	HPDL	2,97	8,50E-08
nucleolar protein 4-like	NOL4L	2,97	1,07E-07
E2F transcription factor 8	E2F8	2,99	3,95E-07
family with sequence similarity 65, member A	FAM65A	3	4,00E-06
membrane associated ring finger 9	MARCH9	3	2,09E-06
interleukin 6 receptor	IL6R	3	7,56E-10
protein tyrosine phosphatase, receptor type, J	PTPRJ	3,03	6,26E-10
metastasis suppressor 1-like	MTSS1L	3,04	9,58E-09
family with sequence similarity 195, member A	FAM195A	3,06	8,31E-08
peptidase M20 domain containing 2	PM20D2	3,06	6,27E-11
sialic acid binding Ig-like lectin 6	SIGLEC6	3,06	1,62E-09
lysosomal-associated membrane protein family, member 5	LAMP5	3,07	5,00E-09
ubiquitin specific peptidase 41	USP41	3,07	2,35E-06
poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)	PVRL1	3,08	2,01E-05
transglutaminase 5	TGM5	3,1	6,84E-07
leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4	LGR4	3,11	1,04E-09
inhibin beta A	INHBA	3,13	3,49E-09
cardiotrophin-like cytokine factor 1	CLCF1	3,14	1,97E-07
dual specificity phosphatase 3	DUSP3	3,15	2,65E-09
histamine receptor H2	HRH2	3,16	5,15E-08
LY6/PLAUR domain containing 6B	LYPD6B	3,16	2,83E-09
nuclear factor, erythroid 2	NFE2	3,18	3,33E-06
tubulin, alpha 4a	TUBA4A	3,19	1,82E-08
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	CEBPE	3,2	1,24E-06
cyclin E2	CCNE2	3,2	3,02E-09
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10	SLC25A10	3,21	4,01E-10
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2RY14	3,22	0,0003
BRI3 binding protein	BRI3BP	3,22	1,12E-11
hematopoietic SH2 domain containing	HSH2D	3,22	2,88E-09
transmembrane protein 223	TMEM223	3,24	1,18E-06
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	NR2F2	3,24	2,94E-08

neuregulin 4	NRG4	3,26	1,12E-06
integrin alpha 4	ITGA4	3,27	1,72E-07
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	P2RY8	3,27	1,70E-09
Homo sapiens purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8 (P2RY8), mRNA.	P2RY8	3,27	1,70E-09
translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	TIMM50	3,28	1,34E-05
sterile alpha motif domain containing 10	SAMD10	3,29	2,56E-07
solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1	SLC29A1	3,3	1,65E-09
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	ST3GAL4	3,31	8,12E-08
family with sequence similarity 101, member B	FAM101B	3,31	4,08E-11
macrophage expressed 1	MPEG1	3,33	1,11E-05
solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	SLCO4A1	3,33	1,82E-06
sorting nexin 10	SNX10	3,34	7,29E-10
thyroid hormone receptor, alpha	THRA	3,4	3,79E-09
3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	BDH1	3,41	2,62E-10
phospholipid phosphatase related 3	PLPPR3	3,41	1,46E-11
platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	PECAM1	3,42	7,27E-10
family with sequence similarity 57, member A	FAM57A	3,43	4,39E-07
hydrogen voltage gated channel 1	HVCN1	3,43	1,14E-07
bone morphogenetic protein 8b	BMP8B	3,43	2,28E-08
tec protein tyrosine kinase	TEC	3,44	5,05E-11
growth differentiation factor 11	GDF11	3,44	9,83E-09
heat shock 70kDa protein 4-like	HSPA4L	3,46	5,68E-08
CD3e molecule, epsilon associated protein	CD3EAP	3,46	5,57E-09
forkhead box A1	FOXA1	3,46	1,71E-09
four and a half LIM domains 3	FHL3	3,49	4,87E-09
solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 16	SLC22A16	3,56	3,35E-08
dachshund family transcription factor 1	DACH1	3,58	1,91E-08
BCL6 corepressor	BCOR	3,59	3,23E-11
tudor domain containing 7	TDRD7	3,6	1,04E-11
Wilms tumor 1	WT1	3,66	3,91E-10
family with sequence similarity 78, member A	FAM78A	3,71	7,36E-07
interferon regulatory factor 8	IRF8	3,81	2,21E-07
mannosidase, endo-alpha-like	MANEAL	3,83	6,55E-07
chemokine (C-X-C motif) receptor 2	CXCR2	3,84	9,52E-10
PHD finger protein 23	PHF23	3,87	1,86E-07
CXXC finger protein 5	CXXC5	3,89	3,82E-09
family with sequence similarity 105, member A	FAM105A	3,9	5,81E-11
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	CEBPA	3,91	1,15E-08
Rho-related BTB domain containing 2	RHOBTB2	4,01	5,26E-10
heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	HS3ST3B1	4,06	2,23E-10
solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 2	SLC29A2	4,1	1,88E-08

ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	UHRF1	4,1	3,88E-11
platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	4,11	3,45E-10
ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	ELK3	4,18	3,70E-08
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2	P2RY2	4,18	3,54E-12
tripartite motif containing 14	TRIM14	4,28	1,03E-09
bone morphogenetic protein 8a	BMP8A	4,57	3,14E-10
CD180 molecule	CD180	4,66	1,63E-05
GRB2-binding adaptor protein, transmembrane	GAPT	4,97	1,08E-11
solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	SLCO4C1	5,18	1,76E-07
GATA binding protein 2	GATA2	5,26	1,79E-09
methyltransferase like 7B	METTL7B	5,4	6,63E-08
cysteinyl leukotriene receptor 1	CYSLTR1	5,48	1,06E-12
kelch-like family member 23	KLHL23	5,5	1,64E-07
family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	5,56	6,25E-11
G protein-coupled receptor 183	GPR183	6	6,14E-11
fibrinogen-like 2	FGL2	6,06	3,22E-07
TGFB-induced factor homeobox 2	TGIF2	6,21	3,46E-12
transmembrane protein 200A	TMEM200A	6,36	8,17E-13
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	6,54	4,84E-11
myosin binding protein H	MYBPH	7,81	4,09E-10
G protein-coupled receptor 85	GPR85	9,26	3,60E-13
chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	18,47	3,32E-13