






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Programa de Doctorat en Biologia i Biotecnologia Vegetal**

**Potencial ús de la curcumina en el
tractament de la Leucèmia
Limfocítica Crònica**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per

Àngel Bistué Rovira

Per optar al Grau de

Doctor en Biologia i Biotecnologia Vegetal



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Programa de Doctorat en Biologia i Biotecnologia Vegetal

**Potencial ús de la curcumina en el tractament de
la Leucèmia Limfocítica Crònica**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per
Àngel Bistué Rovira

Per optar al Grau de
Doctor en Biologia i Biotecnologia Vegetal

Investigació realitzada a l'**Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras**
Tesi doctoral realitzada sota la direcció del **Dr. Jordi Pétriz González** i **Dr. Francesc Solé Ristol**
i la tutoria del **Dr. Josep Allué Creus**

Àngel Bistué Rovira
El Doctorand

Jordi Pétriz i Francesc Solé
Els Directors de Tesi

Josep Allué Creus
El Tutor de Tesi

Bellaterra, 2020

El Dr. Jordi Pétriz González, líder del Grup d'Investigació de Citòmica Funcional de l'Institut d'Investigació Contra la Leucèmia Josep Carreras del Campus ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona),

CERTIFICA:

Que Àngel Bistué Rovira ha realitzat sota la seva direcció i supervisió el treball d'investigació que s'exposa en la memòria de Tesi titulada "Potencial ús de la curcumina en el tractament de la Leucèmia Limfocítica Crònica" per a optar al Grau de Doctor en Biologia i Biotecnologia Vegetal per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme en el Grup d'Investigació de Citòmica Funcional de l'Institut d'Investigació contra la Leucèmia Josep Carreras, Campus ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona).

I perquè així consti, se signa el present certificat:

Jordi Pétriz González
El Director de Tesi

Àngel Bistué Rovira
El Doctorand

Badalona, 2020

Al meu avi

Agraiments

Ja quasi enllestida la part científica, i ara que tinc una mica més de temps, em dispenso a escriure una de les parts més importants d'aquest treball. Perquè jo sol no hauria arribat fins aquí. I no ho dic per dir, si el doctorat ja m'ha semblat dur, estic convençut que sense suport acadèmic, tècnic, però sobretot, emocional, hauria estat del tot impossible. Per això vull donar sincerament les gràcies a tots els qui m'heu acompanyat i ajudat al llarg d'aquests tres anys. Em temo que serà impossible no deixar-me a ningú, ja que faig memòria, i sou molts, aquells a qui voldria donar les gràcies. A vegades només són unes paraules, creuar-se puntualment, però una salutació amable o el simple bon humor que es transmet, tenen un gran valor. Per això em disculpo per endavant a tots aquells a qui no anomeni, sapiguen que teniu la meva gratitud.

Vull agrair, per començar, a la meva família i amics la paciència que han tingut amb mi tots els cops que estava més baix d'ànims, així com les converses que hem pogut mantenir i les bones estones que hem passat i que han estat terapèutiques. Vull donar les gràcies a **la meva mare**, per la paciència i les estones de teràpia psicològica tots aquells cops que estava més baix d'ànims. Dono les gràcies, també, **al meu pare**, per aconsellar-me quan ho he necessitat i per ajudar-me tots els cops que he tingut problemes i dubtes informàtics. Gràcies, **Miquel**, per totes les excursions i passejades que hem fet aquest temps, per totes les estones que hem pogut xerrar, per saber escoltar i per la teva visió calmada i sàvia. Gràcies, **Maria**, per tant com m'has ajudat en qüestions d'imatge i programes informàtics, una part de la tesi és mèrit teu. Gràcies, **Anto**, per ser la millor tieta del món, per pensar sempre en els altres i per ser una *ironwoman* i estar sempre a punt per anar a la muntanya. Gràcies, **iaio**, per interessar-te sempre i preguntar-me per com m'anava la feina durant tots aquests anys. De manera especial, vull donar les gràcies al meu **avi** i la meva **àvia**, que no han pogut veure el final d'aquesta etapa que tanta il·lusió els va fer quan va començar. Moltes gràcies per tot el temps que m'heu acompanyat i els bons moments que hem passat junts. Us trobo a faltar, i m'hauria agradat que hi poguéssiu ser el dia de la defensa. No obstant, vosaltres sempre sou amb mi.

Gràcies, **Sergi**, per haver estat el company més fidel d'excursions aquests darrers anys, per estar sempre a punt per les propostes que et faig, ja sigui a peu o amb bicicleta, pel teu caràcter animós que s'encomana i per ser tan bon amic. Gràcies, **Bene**, pel teu caràcter tan optimista i empàtic i per pensar en mi tan sovint quan organitzes tornejos de jocs de taula. Gràcies, també, **Toni**, per ser-hi en els bons i els mals moments, ets un bon amic en qui es pot comptar. Gràcies, **Josep**, per haver trobat sempre temps per quedar quan has vingut per aquí, i pels bons plans que organitzes i les converses tan agradables que es poden tenir amb tu. Gràcies, també, **Pere**, per reservar sempre algun dia per quedar quan has vingut i per la teva motivació per fer trobades sempre que hem pogut. Gràcies, **Núria Massip**, per estar sempre a punt per donar-me un cop de mà quan he tingut algun dubte, per la teva bona amistat i per ser una persona amb qui es fa agradable xerrar. Gràcies, **Clara**, pel teu caràcter tan animós, per apuntar-te a les sortides sempre que has pogut i per haver-me ajudat i aconsellat amb tant d'interès sempre que t'ho he demanat. Vull donar les gràcies, també, al **Xavier Bustins**, gran professor i amic, per ser un dels primers incitadors que em va animar a entrar a la "secta de la biologia". També vull agrair les estones i xerrades que hem compartit al **Josep Maria**, l'**Adrià**, l'**Oriol**, la **Núria**, la **Gisela** i l'**Anna**, i a tants altres bons amics amb qui sé que puc comptar sempre. Durant el doctorat no sempre he tingut tot el temps que hauria volgut, espero que ara ens puguem veure més.

Vull donar les gràcies al meu director, el **Jordi Petríz**, així com als meus companys de laboratori, la **Laura García** i el **Jorge Bardina**, per tot el que hem compartit aquest

temps, i per tot el que m'heu ensenyat sobre cultius cel·lulars, citometria, citòmica i tants altres camps relacionats amb les cèl·lules i la seva fisiologia que abans de començar m'eren desconeguts. Així mateix, us agraeixo la paciència que us ha calgut alguna vegada per fer-me entendre alguns d'aquests temes, i em disculpo si algun cop que em veia desbordat no he estat prou agraït. **Jorge**, gràcies per estar sempre a punt per ajudar, pels teus bons consells informàtics i mecànics i per ser un bon company amb qui sempre es pot xerrar. Molts ànims amb el que et queda de tesi, espero veure't aviat com a doctor! **Laura**, moltes gràcies per tant com m'has ajudat tantes vegades, dono fe que ets una crack de la citometria i del laboratori en general, i una gran *jefa* i millor amiga. Aprofito per disculpar-me per si algun cop t'he fet parar una mica boja preguntant-te repetidament on es guarden les coses o com es fa el *gating*. **Jordi**, t'agraeixo molt tot el guiatge d'aquests anys, he après moltes coses i he tingut molt bones experiències. Ets un bon director, molt polifacètic, i, sobretot puc dir, un mestre que no deixa indiferent. Em disculpo si algun cop he estat una mica *rebelde*, he volgut fer les coses a la meua manera o no m'he fiat prou de les teves previsions. Però suposo que en el fons, tot això són les "virtuts" del científic.

També vull agrair al meu codirector **Francesc Solé** la bona disposició sempre que he necessitat res, la gran ajuda que m'has proporcionat al llarg d'aquesta Tesi i el teu tracte amable i proper, que ho fa tot més fàcil.

Vull donar les gràcies al meu tutor, el **Josep Allué**, per haver-hi estat sempre que he necessitat res, pels teus bons consells i guiatge i per la proximitat sempre que he necessitat parlar per informar-me o simplement xerrar. Alhora, us voldria agrair a tu i al Jordi Petritz, haver-me animat a fer encaixar el programa de doctorat de Biologia i Biotecnologia vegetal amb la recerca de l'Institut Carreras. Tot i que aquesta barreja experimental ha estat complicada en algun moment, sempre m'havia interessat molt l'estret camp en què es troben les plantes i la salut humana, i us agraeixo haver-ho fet possible. Espero seguir aprenent sobre aquest camp en què m'heu ajudat a iniciar-me al llarg d'aquests tres anys.

Vull donar les gràcies al **Jordi Juncà**, per la teva gran implicació i interès sempre que he necessitat res, per la gran ajuda que suposen la teva experiència i coneixement i pel teu tracte agradable i enriquidor, amb aquest punt de calma que transmetes sempre.

Gràcies a tot l'equip de Citometria de l'ICO, al **Marc**, per l'entusiasme amb què has rebut sempre qualsevol proposta i per la disponibilitat i dedicació sempre que t'he hagut de demanar ajuda. Igualment, a la **Sara** i la **Minerva**, per tant com m'heu ajudat, per l'amabilitat i el bon humor amb què treballem, per les facilitats que m'heu donat sempre que he necessitat alguna cosa i per la paciència que heu tingut tots els cops que us he entretingut quan ja estàveu prou enfeïnades. Vull donar les gràcies també a la **Marian**, la **Cristina** i l'**Ester**, amb qui també he tingut la sort de tractar puntualment, per la bona feina que feu i per la vostra amabilitat i simpatia.

Vull agrair a la **Marta Crespo** l'haver-me proporcionat les tres línies cel·lulars de LLC amb què he estat treballant tot aquest temps, i amb què hem pogut realitzar tantes proves.

Mike i **Jolene**, tot i que no ens hem arribat a conèixer personalment, esteu molt presents en la feina que realitzem cada dia, us vull agrair el luxe que suposa poder disposar de la vostra tecnologia al laboratori, així com la vostra amabilitat i celeritat sempre que hem necessitat res o hem col·laborat. Gràcies, també, **Pepe**, per la teva simpatia i bon tracte sempre que hem coincidit, i juntament amb els teus companys de Sysmex, pel vostre

interès, motivació i generositat que contribueixen al bon funcionament del nostre laboratori.

Gràcies, **Elisa**, per tots els dubtes que m'has resolt sobre citomorfologia i per les facilitats cada vegada que he volgut utilitzar el microscopi múltiple. Moltes gràcies també a totes les residents amb qui he compartit el microscopi, per la bona disponibilitat i les facilitats que m'heu donat per quadrar horaris. Moltes gràcies també al **Tomàs**, per tots els consells clínics que m'has donat i per ser una persona tan propera, amb qui he pogut parlar sempre que he tingut cap dubte o he necessitat res. T'estic molt agraït, **Joao**, per la teva motivació i la teva gran disponibilitat a ajudar-me sempre, fins i tot abans de demanar-t'ho. Gràcies també a **l'Eulàlia**, per tots els consells i orientació que m'has donat.

Gràcies a tots els amics de la tercera planta, Jordi, Celia, Josep i Míriam, per totes les bones estones que hem passat junts, pel vostre bon humor que s'encomana i per haver pogut comptar amb vosaltres sempre he necessitat res. Gràcies, **Jordi Ribera**, per tot el que m'has ajudat, per tots els ànims que m'has donat i pel bon rotllo que transmetes sempre, xerrar amb tu o fer broma dona bones vibracions. **Josep**, se't troba a faltar, aquell bon humor amb un punt de surrealisme que a vegades et deixava descol·locat valia molt! Espero que et segueixi anant tot molt bé i que ens anem veient. **Celia** i **Miriam**, heu estat molt bones companyes les dues, he gaudit molt de les converses amb vosaltres, sobretot les de lèxic i costums d'Albacete, València i Catalunya. Espero que ens anem veient i que algun dia us acabeu animant a fer alguna excursió amb mi.

No menys propers, també vull agrair l'amistat, les bones estones i l'ajuda rebuda sempre que he necessitat res, a totes les amigues i l'amic de la segona planta. **Mar**, moltes gràcies per tots els cops que m'has aconsellat i per ser una persona propera amb qui es pot xerrar i fer broma amb confiança. **Laura Palomo**, gràcies per la teva gran amabilitat i per haver-me ajudat sempre que t'he demanat res. Gràcies, **Rocío**, per haver-me ajudat tant al principi, i més recentment, per haver-me salvat la vida més d'un cop amb mostres que se m'havien colat. **Paula**, gràcies per la teva simpatia, per ser una persona amb qui sempre es pot parlar i per la teva disponibilitat sempre que he necessitat res del Biobanc. Gràcies, **Nuri**, per la teva motivació i inestimable implicació sempre que s'ha organitzat res. Gràcies, **Jessica Aranda** pel teu bon tacte i simpatia sempre que hem xerrat o he vingut a demanar res. **Francisco**, gràcies pel teu bon humor i tot el que he après de música amb tu. Gràcies, **Pame**, per la teva simpatia i bon tracte. **Jessica Tijero**, hem coincidit poc temps però ha estat ben aprofitat, gràcies per les bones converses que hem pogut tenir sobre plantes i muntanya, espero que ens seguim veient. El mateix et dic, **Ana**, sempre és agradable parlar amb tu, no perdís mai aquest caràcter tan alegre i amable. **Natalia**, gràcies per la teva simpatia i bon tracte, ha estat un plaer treballar amb tu quan has vingut per temes de cultius o citometria.

No em voldria oblidar tampoc de tots aquells amb qui vaig coincidir més al principi o de forma més fugaç, i amb qui he passat bones estones plegats: **Dani**, **Neus**, **Guillem**, **Francisco**, **Helena**, **Vera**, **Paula**.

Molt agraït també a tota la gent de biologia molecular, la **Lurdes**, la **Marta**, la **Sílvia**, el **Pepe**, la **Itziar**, la **Diana**, l'**Olga** pel bon humor que es respira sempre a prop vostre i per tot el que he pogut aprendre. Gràcies també al laboratori de citogenètica, la **Isabel**, el **Javier**, la **Neus**, l'**Adela**, la **Marisol**, l'**Aleix**, la **Nani**, la **Carmen**, també per ser persones de tan bon tracte i per tot el que m'heu ajudat en qüestió de cariotips.

Tot i haver tingut un contacte menys directe, estic molt agraït també a tots els metges que he pogut conèixer al llarg d'aquesta etapa, per la gran tasca que fan i per tot el que he pogut aprendre d'ells. Voldria donar les gràcies especialment a la **Fuensanta**, el **Josep Maria**, la **Blanca**, la **Christelle**, el **Juan Manuel Sancho**, la **Inés**,

Vull donar les gràcies a l'Albert i l'Alba, per la vostra feina, col·laboració i també per les bones estones que hem pogut xerrar i fer broma. Gràcies, **Albert**, per tots els cops que, gràcies a tu, no he hagut de dinar sol. Gràcies, **Alba**, per orientar-me tots els cops que buscava perdut alguna cosa per la *kitchen*. També vull agrair al **David** i l'**Adrià** l'ajuda proporcionada a l'inici d'aquest camí.

Moltes gràcies, **Emili**, per haver-me ajudat tants cops, sobretot al laboratori de cultius, quan al principi anava més perdut, així com pel teu caràcter animós i per les converses que hem tingut al llarg de les moltes hores que hem compartit entre cèl·lules. Moltes gràcies també a tanta altra bona gent que he conegut als laboratoris de cultius i que m'heu ajudat i heu fet les llargues estones de pipeteig més agradables. Em temo que serà impossible no deixar-me a ningú, però voldria anomenar especialment a la **Mar Muñoz**, les **Cristines Moreta i Queralt**, la **Sarah**, l'**Antònia**...

Tot i que hem coincidit menys al laboratori, vull agrair a tota la gent dels grups del Marcus, la Biola i la Ruth la bona disposició que heu tingut sempre per orientar-me, aconsellar-me o donar-me un cop de mà, així com la vostra proximitat i simpatia. Ha passat molta gent, en aquests anys, i em temo que em deixaré algú, però no per això voldria estar-me d'anomenar aquells amb qui he tingut més tracte, **Sarah**, **Raquel**, **Marguerite Marie**, **David**, **Roberto**, **Marcus**, **Llorenç**, **Biola**, **Antònia**, **Pepe**, **Laia**, **Ruth**.

Vull agrair, **Fumi** i **Miyako**, la vostra proximitat i bon ambient que genereu sempre, així com el vostre interès per com m'anava tot, i la vostra disponibilitat a ajudar sempre que he necessitat res durant aquests anys.

Vull donar les gràcies a tots els membres de la unitat de Fisiologia Vegetal de la UAB, per la seva amabilitat i atenció que han fet que em sentís com a casa tots els cops que hi he anat. Voldria donar les gràcies especialment a la **Charlotte** i la **Roser**, per tota l'ajuda i assessorament sempre que he tingut dubtes sobre el programa de doctorat. També vull agrair a la **Laura Pérez** i la **Soledad** les estones que hem pogut xerrar tranquil·lament al llarg d'aquest temps, l'haver pogut contrastar punts de vista sobre la investigació i els ànims que m'heu donat sempre.

Vull acabar donant les gràcies a l'**Evarist Feliu**, per la gran persona que és i la seva voluntat per ajudar sempre, la seva amistat és impagable. Gràcies per haver-me posat en contacte amb l'Institut Carreras i haver-me permès així de formar part tot aquest temps d'aquesta gran família en la lluita contra la leucèmia.

Índex

| | |
|--|----|
| Agraïments | 9 |
| Abreviacions | 19 |
| Introducció | 23 |
| 1. Leucèmia limfocítica crònica | 25 |
| 1.1. Aspectes generals | 25 |
| 1.2. Mutacions i marcadors | 29 |
| 1.3. Tractaments | 34 |
| 1.4. Cèl·lules mare leucèmiques | 36 |
| 2. Apoptosi en la LLC | 38 |
| 2.1. P53 | 38 |
| 2.2. BCL-2 | 39 |
| 2.3. Caspases | 40 |
| 2.4. NOTCH | 40 |
| 2.5. NFκB | 41 |
| 2.6. Via Wnt | 42 |
| 2.7. JAK-STAT | 43 |
| 3. Resistència a fàrmacs | 44 |
| 4. Curcumina | 46 |
| 4.1. Origen | 46 |
| 4.2. Biosíntesi | 49 |
| 4.3. Propietats químiques i físiques | 51 |
| 4.4. Farmacologia | 52 |
| 5. Fàrmacs | 59 |
| 5.1. Etopòsid | 59 |
| 5.2. Camptotecina | 60 |
| 5.3. Colquicina | 61 |
| 5.4. Citarabina | 62 |
| 5.5. Fludarabina | 63 |
| 5.6. Rituximab | 64 |
| 5.7. Ibrutinib | 65 |
| 5.8. Venetoclax | 66 |

| | |
|---|-----|
| Hipòtesi | 67 |
| Objectius | 71 |
| Material i mètodes | 75 |
| 1. Línies cel·lulars | 77 |
| 1.1. I83 | 77 |
| 1.2. Mec1 | 77 |
| 1.3. EHEB | 78 |
| 2. Cultius primaris | 79 |
| 3. Fàrmacs i curcumina | 80 |
| 4. Reactius i materials | 81 |
| 5. Equipaments | 84 |
| 5.1. Citometria de flux | 84 |
| 5.2. Microscòpia òptica | 85 |
| 5.3. Cultius cel·lulars | 86 |
| 6. Cultius cel·lulars i incubació amb fàrmacs | 87 |
| 7. Anàlisi de la integritat de la membrana cel·lular i de la proliferació | 89 |
| 8. Anàlisi del cicle cel·lular | 90 |
| 9. Anàlisi de la citomorfologia | 91 |
| 10. Immunofenotipatge | 92 |
| 11. Anàlisi de la producció de ROS en línies cel·lulars | 93 |
| 12. Anàlisi de l'extrusió de fàrmacs | 94 |
| 13. Anàlisi de l'activitat fosfatasa alcalina en línies cel·lulars | 95 |
| 14. Anàlisi de caspases | 96 |
| 15. Anàlisi de la combinació de la curcumina i fàrmacs sobre els cultius primaris | 98 |
| 16. Anàlisi de les dades | 99 |
| Resultats | 101 |
| 1. Caracterització de les línies cel·lulars | 103 |
| 1.1. Citomorfologia | 103 |
| 1.2. Immunofenotip | 104 |
| 1.3. Anàlisi del cicle cel·lular | 104 |
| 1.4. Anàlisi de clonalitat | 105 |
| 2. Anàlisi de l'efecte sinèrgic de la curcumina sobre els fàrmacs | 107 |
| 2.1. Controls i curcumina | 107 |
| 2.2. Etopòsid | 112 |
| 2.3. Camptotecina | 117 |
| 2.4. Colquicina | 122 |

| | |
|---|-----|
| 2.5. Citarabina..... | 127 |
| 2.6. Fludarabina | 131 |
| 2.7. Ibrutinib i venetoclax..... | 137 |
| 3. Efectes de la curcumina sobre la producció de ROS..... | 139 |
| 4. Extrusió de fàrmacs | 143 |
| 5. La curcumina té un efecte modulador sobre l'activitat fosfatasa alcalina en les línies cel·lulars estudiades de LLC..... | 148 |
| 6. Efecte de la curcumina sobre l'activitat caspasa | 150 |
| 7. Anàlisi de l'efecte sinèrgic de la curcumina i fàrmacs en cultius primaris de LLC | 153 |
| 7.1. Característiques dels pacients | 154 |
| 7.2. Factors de risc..... | 158 |
| 7.3. Estudi de l'efecte sinèrgic de la curcumina sobre diferents fàrmacs antileucèmics | 160 |
| Discussió..... | 167 |
| Conclusions..... | 193 |
| Bibliografia..... | 197 |
| Material suplementari | 221 |

Abreviaciones

ABC: ATP-Binding Cassette
 ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity – Citotoxicitat dependent de complement mediada per cèl·lules
 ALP: Alkaline Phosphatase – Fosfatasa alcalina
 APAF1: Apoptotic Protease Activating Factor-1
 APLS: Alkaline Phosphatase Live Stain
 AraC: Cytosine arabinoside – Arabinòsid de citosina
 BCL-2: B-Cell Lymphoma 2 protein
 BCRP: Breast Cancer Resistance Protein
 BP: Bandpass - Pas de banda
 B-PLL: B-cell Prolymphocytic Leukemia – Leucèmia Prolimfocítica de cèl·lules B
 BTK: Bruton's Tyrosine Kinase – Tirosina cinasa de Bruton
 Campt: Camptotecina
 CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity – Citotoxicitat mediada per complement
 CDI: Coefficient of Drug Interaction – Coeficient d'interacció de fàrmacs
 CF: Concentració Final
 Cit: Citarabina
 Colq: Colquicina
 COX-2: Cyclooxygenase-2 – Ciclooxygenasa-2
 DAPI: Diamino-2-phenylindole – Diamino-2-fenilindol
 DHR: Dihydrorhodamine 123 – Dihidrorodamina 123
 DLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma – Limfoma difús de cèl·lula B gran
 DLP: Dichroic longpass – Dicroic de pas llarg
 DMSO: Dimethyl sulfoxide - Dimetilsulfòxid
 Doxo: Doxorubicina
 EBV: Epstein-Barr Virus - Virus Epstein-Barr
 EDTA: Etilendiaminotetraacetic acid - Àcid etilendiaminotetraacètic
 EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
 ELAM: Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule
 Ep: Etopòsid
 ERK: Extracellular-Signal-Regulated Kinases
 Fab: Fragment antigen-binding – Fragment d'unió a antigen
 FBS: Fetal Bovine Serum - Sèrum Fetal Boví
 Fc: Fragment crystallizable – Fragment cristal·litzable
 FCR: Fludarabina-Ciclofosfamida-Rituximab
 FDA: Food and Drug Administration
 FGF: Fibroblast Growth Factor
 FISH: Fluorescent *In Situ* Hybridization – Hibridació Fluorescent *In Situ*
 FITC: Fluorescein Isothiocyanate – Isotiocianat de Fluoresceïna
 Fluda: Fludarabina
 FSC: Forward Scatter – Dispersió Frontal de la llum
 HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution
 HL: Hodgkin Lymphoma – Limfoma de Hodgkin
 Ho342: Hoechst 33342
 HSC: Hematopoietic Stem Cell – Cèl·lules mare hematopoètiques
 IAP: Inhibitors of Apoptosis
 Ibru: Ibrutinib
 ICAM: Intercellular Adhesion Molecule

IGHV: Immunoglobulin Heavy Chain Variable – Regió variable de la cadena pesada d'Immunoglobulina
iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase – Sintasa induïble d'òxid nítric
IRF: Intensitat Relativa de Fluorescència
i.v.: Intravenós
JAK: Janus Kinases – Janus Cinases
LDH: Lactat deshidrogenasa
LLC: Leucèmia Limfocítica Crònica
LP: Longpass – Pas llarg
MAPK: Ras/Raf Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL: Monoclonal B Lymphocytosis – Limfocitosi B Monoclonal
MDR: Multidrug Resistance – Resistència a fàrmacs
MHC: Major Histocompatibility Complex – Complex d'histocompatibilitat principal
MIF: Mitjana d'Intensitat de Fluorescència
MMP: Matrix Metalloproteinase – Metaloproteïna de matriu
MMR: Malaltia Mínima Residual/Malaltia Mesurable Residual
MRP1: Multidrug Resistance-associated Protein 1
MTX: Mitoxantrona
NFκB: Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS: Next Generation Sequencing
Nrf2: Nuclear factor-like 2
OMT: O-metiltransferasa
OMS: Organització Mundial de la Salut
OS: Overall Survival – Supervivència Global
PAL: Phenylalanine Ammonia-Lyase – Fenilalanina Amoni-Liasa
P-gp: P-Glycoprotein - Glicoproteïna P
PI: Propidium Iodide - Iodur de Propidi
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate – Forbol 12-miristat 13-acetat
PPARγ: Peroxisome Proliferator-Associated Receptor γ
Rho123: Rhodamine 123 - Rodamina 123
Ritux: Rituximab
ROI: Reactive Oxygen Intermediates – Intermediaris reactius de l'oxigen
ROS: Reactive Oxygen Species – Espècies reactives de l'oxigen
SHM: Somatic Hypermutation - Hipermutació Somàtica
SLL: Small Lymphocytic Lymphoma – Limfoma limfocític de cèl·lules petites
SMAC: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SP: Shortpass – Pas curt
SSC: Side Scatter – Dispersió Lateral de la llum
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TBHP: Tert-butil hidroperòxid
TLR: Toll-like Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor - Factor de Necrosi Tumoral
UPLC: Ultraperformance Liquid Chromatography – Cromatografia líquida de molt alta resolució
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Veneto: Venetoclax

Introducció

1. Leucèmia limfocítica crònica

1.1. Aspectes generals

La leucèmia limfocítica crònica (LLC) és una malaltia hematològica originada per una expansió anormal de cèl·lules B. Aquesta expansió pot causar una infiltració patològica i generar limfadenopatia, esplenomegàlia i hepatomegàlia, entre d'altres. També pot causar un desplaçament d'altres poblacions immunitàries i generar immunodepressió. Normalment no s'aconsegueix una remissió completa, de manera que es requereix un seguiment de la malaltia i, en molts casos, medicació crònica^{1,2}.

La LLC té una elevada incidència en països occidentals, al voltant de 4,2 casos per cada 100.000 habitants a l'any¹, i representa un 30% de tots els casos de leucèmia³. En canvi, és una malaltia molt menys freqüent en països asiàtics⁴. En adults majors de 80 anys, la incidència augmenta fins a 30 casos per cada 100.000 persones a l'any. L'edat mitjana al diagnòstic són 72 anys, i al voltant d'un 10% dels pacients són menors de 55 anys¹. És més freqüent en homes que en dones (fins al doble d'incidència)⁴. Les persones amb familiars propers que han patit LLC tenen un risc entre 2 i 7 vegades major de contraure la malaltia. En aquest cas es parla de LLC familiar, que suposa un 5-10% dels pacients^{1,4}.

Els estadis primaris de la malaltia solen ser asimptomàtics, i la majoria de casos es diagnostiquen per anàlisis de sang rutinàries. En estadis més avançats es pot presentar limfadenopatia, hepatomegàlia, esplenomegàlia, trombocitopènia, anèmia, infeccions recurrents, debilitat, pal·lidesa, diàtesi hemorràgica, febre, pèrdua de pes i suors nocturnes^{3,4}. La progressió de la malaltia sol anar associada a un augment de la mida i dels nivells de proliferació de les cèl·lules leucèmiques de LLC⁴.

Els pacients amb LLC tenen un major risc, d'entre 2 i 7 vegades superior que la mitjana de la població, de desenvolupar càncers secundaris (sobretot tumors sòlids, però també síndromes mielodisplàstiques o leucèmia mieloide aguda)¹. Entre un 2 i un 15% dels pacients patiran transformació a limfoma de Hodgkin (*Hodgkin Lymphoma*, HL) o limfoma difús de cèl·lula B gran (*Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, DLBCL) al llarg de la malaltia¹. Mentre que la transformació a HL es pot tractar amb quimioteràpia convencional per a aquesta malaltia i sol presentar taxes de remissió llargues, la transformació a DLBCL, anomenada transformació de Richter, sol tenir molt mal pronòstic¹ (supervivència mitjana de menys d'1 any^{4,5}). La transformació a DLBCL està associada amb mutacions de *TP53* i *NOTCH1*, delecions de *CDKN2A* i translocacions de *MYC*⁴.

L'expansió anormal de les cèl·lules B que es produeix en la LLC està causada per una resistència a l'apoptosi incrementada, més que no pas per un augment de la proliferació^{6,7}. A causa d'aquesta resistència incrementada, es manté un romanent de cèl·lules malgrat els tractaments, anomenat Malaltia Mínima Residual o Malaltia Mesurable Residual (MMR), que consisteix en la presència

de poblacions de cèl·lules resistents al tractament, difícils de detectar a causa de la reduïda presència en sang i medul·la òssia, amb la capacitat de regenerar la malaltia quan es deixa d'administrar el tractament⁸. En la LLC, la detecció de la MMR mitjançant citometria de flux és una prova que es considera que té un impacte pronòstic important, atès que els pacients amb una MMR negativa després d'un tractament demostren temps de resposta i supervivència més llargs^{1,9}. Per això, assolir l'increment dels nivells d'apoptosi de les cèl·lules leucèmiques és un objectiu de gran rellevància, per reduir al màxim la MMR i millorar el tractament de la LLC, ja que podria ser decisiu per eliminar aquests reservoris residuals de malaltia i aconseguir una remissió completa².

Un dels principals criteris en el diagnòstic de la LLC és un recompte de limfòcits B clonals en sang perifèrica superior a 5000/ μ L. La població leucèmica sol ser morfològicament uniforme, amb cèl·lules més petites en comparació amb els limfòcits B normals, amb aparença de limfòcits madurs, amb un nucli dens i sense nuclèols distingibles i cromatina parcialment agregada. El citoplasma és escàs en comparació amb el nucli i es distribueix en un marge estret^{1,4}. Les cèl·lules de LLC presenten un origen i evolució clonal, amb el gen de la regió variable de la cadena pesada d'immunoglobulina (*Immunoglobulin Heavy chain Variable, IGHV*) conservat. La malaltia es localitza en sang perifèrica, medul·la òssia i teixits limfoides secundaris com la melsa i els nòduls limfàtics⁴. La clonalitat de les cèl·lules B circulants ha de ser confirmada per citometria de flux o per tècniques de biologia molecular¹.

En la majoria dels casos, les cèl·lules de la LLC coexpressen CD5 (propi de cèl·lules T) a la superfície cel·lular, a més dels marcadors típics de cèl·lules B (CD19, CD20 i CD23). Tot i això, els nivells d'immunoglobulina de superfície, CD20 i CD79b són més baixos que els de les cèl·lules B normals^{1,4,10}. A més, les cèl·lules de LLC solen presentar una expressió elevada de CD43 i CD200, una expressió reduïda de CD22, i són negatives per CD10. La coexpressió del marcador CD5 és molt característica i té una gran utilitat per identificar les cèl·lules de la LLC, encara que hi ha casos en què, malgrat reunir totes les característiques clíniques pròpies de la LLC, les cèl·lules presenten un immunofenotip atípic i no expressen CD5. Les LLC negatives per CD5 suposen al voltant d'un 7-20% dels casos, i podrien estar associades amb una major incidència d'esplenomegàlia, tot i que el pronòstic seria similar al de les LLC amb expressió de CD5¹¹.

Segons la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), la LLC es considera la mateixa entitat que el Limfoma Limfocític de Cèl·lules Petites (*Small Lymphocytic Lymphoma, SLL*)⁴. Pel diagnòstic del SLL es requereix la presència de limfadenopatia i/o esplenomegàlia, a diferència de la LLC, amb un recompte de limfòcits B en sang perifèrica que no excedeixi els 5000/ μ L⁴. Les cèl·lules d'ambdues malalties presenten el mateix immunofenotip¹.

D'altra banda, si no hi ha limfadenopatia, organomegàlia, citopènia ni símptomes clínics, la presència en sang perifèrica de limfòcits B monoclonals sense arribar a excedir els 5000/ μ L, es defineix com a limfocitosi B monoclonal (*Monoclonal B Lymphocytosis, MBL*), la qual es pot detectar en un 5% d'individus amb recompte

de sang perifèrica normal. Avui dia se sap que hi ha una progressió de MBL a LLC d'un 1-2% per any^{1,4}.

Malgrat que les cèl·lules de la LLC són característicament més petites que els limfòcits B normals, en les mostres de sang dels pacients s'hi pot trobar la presència d'alguns limfòcits més grans. Aquests no haurien de superar el 55% dels limfòcits¹, si fos el cas, es parlaria de LLC atípica⁴. Tot i la seva rellevància clínica, ja que estaria relacionada amb un curs més agressiu de la malaltia, el concepte de LLC atípica no està del tot ben definit i sembla que no es tractaria d'una única entitat biològica¹². D'altra banda, en el cas que es detectés més d'un 55% de prolimfòcits, es tractaria d'una leucèmia prolimfocítica de cèl·lules B (*B-cell Prolymphocytic Leukemia*, B-PLL). Els prolimfòcits es caracteritzen per ser més grans que els limfòcits normals, aproximadament el doble de mida, amb nucli rodó, cromatina moderadament condensada, nuclèol prominent i citoplasma escàs respecte al nucli i moderadament basofílic. La B-PLL presenta una resposta pobra als tractaments, i la mitjana de supervivència és de 30-50 mesos. S'aconsella contemplar el tractament amb quimioteràpia combinada amb rituximab i valorar la possibilitat de realitzar un transplantament hematopoètic al·logènic⁴.

D'altra banda, el diagnòstic de la LLC pot presentar dificultats per la seva similitud amb altres malalties hematològiques, com el limfoma de zona marginal, el limfoma limfoplasmàtic o el limfoma de cèl·lules del mantell. Aquestes entitats també expressen marcadors de cèl·lules B, i a diferència de la LLC, no solen expressar CD23¹.

La fase de la malaltia es determina utilitzant la classificació de Binet¹³ o el sistema de Rai¹⁴ (**Taula 1**), encara que aquests índexs no permeten predir la progressió que tindrà la malaltia³. La primera classificació és més utilitzada a Europa, mentre que la segona està més estesa als Estats Units. Totes dues distingeixen tres grups de pacients amb diferent pronòstic. Amb els nous tractaments, han millorat els pronòstics de tots tres estadis, en comparació amb el que es va definir inicialment³.

Per determinar el pronòstic es consideren certes característiques del pacient, com l'edat i el sexe; paràmetres moleculars que confereixen un pronòstic advers, com els nivells de β -2 microglobulina^{4,15-17}, l'expressió de la proteïna ZAP-70^{4,18,19}, l'expressió de l'antigen CD38^{4,18,20} o la de l'antigen CD49d⁴; i anàlisis citogenètiques com el cariotipat o la *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH)^{21,22}. Les anàlisis citogenètiques són especialment importants pel pronòstic. Les delecions 11q (braç llarg del cromosoma 11) es correlacionen amb limfadenopatia i una ràpida progressió de la malaltia i són indicadores d'un mal pronòstic en pacients joves (menys de 55 anys)^{4,23}. Les delecions 17p (braç curt del cromosoma 17) estan associades amb una supervivència curta, de 2-3 anys, i amb una falta de resposta als tractaments amb agents alquilants i anàlegs de purines^{1,4,24}. La deleció del gen *TP53*, que es troba en el braç curt del cromosoma 17, també resulta molt determinant, ja que va lligada a una major resistència a la quimioteràpia amb fludarabina i a un pitjor pronòstic^{4,25,26}. L'estatus dels gens *IGH* també influeix en el pronòstic de la malaltia, amb un major risc en aquells pacients que no els tenen mutats^{4,18}.

Altres factors que confereixen un pitjor pronòstic són la presència d'un cariotip complex (amb tres o més aberracions cromosòmiques, ja siguin estructurals o numèriques), la duplicació del nombre de limfòcits en sang perifèrica en un període de temps inferior a 12 mesos, o les mutacions en els gens *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, *SF3B1* i *BIRC3*⁴.

Taula 1: Sistemes de classificació de Binet i Rai, adaptat d'Eichhorst et al., 2015¹.

| Estadi | Definició | Supervivència mitjana |
|----------------------|---|-----------------------|
| Sistema Binet | | |
| Binet A | Hb \geq 10,0 g/dL, trombòcits \geq $100 \times 10^9/L$, < 3 regions ganglionars | > 10 anys |
| Binet B | Hb \geq 10,0 g/dL, trombòcits \geq $100 \times 10^9/L$, \geq 3 regions ganglionars | > 8 anys |
| Binet C | Hb < 10,0 g/dL, trombòcits < $100 \times 10^9/L$ | 6,5 anys |
| Sistema Rai | | |
| <i>Baix risc</i> | | |
| Rai 0 | Limfocitosi > $15 \times 10^9/L$ | > 10 anys |
| <i>Risc intermig</i> | | |
| Rai I | Limfocitosi i limfadenopatia | > 8 anys |
| Rai II | Limfocitosi i hepatomegàlia i/o esplenomegàlia amb/sense limfadenopatia | |
| <i>Alt risc</i> | | |
| Rai III | Limfocitosi i Hb < 11,0 g/dL amb/sense limfadenopatia/organomegàlia | 6,5 anys |
| Rai IV | Limfocitosi i trombòcits < $100 \times 10^9/L$ amb/sense limfadenopatia/organomegàlia | |

Regions ganglionars: regions afectades per limfadenopatia, de forma uni- o bilateral: cervical, axil·lar, àrees inguinals, melsa, fetge. Hb: hemoglobina.

1.2. Mutacions i marcadors

L'estudi de les mutacions implicades en el desenvolupament i la progressió de la LLC és recent i ha estat poc aplicat a la pràctica clínica, fora de les mutacions comentades prèviament, que actualment s'utilitzen com a indicadors amb valor pronòstic. La causa és que el patró de mutacions somàtiques en regions codificants en la LLC és d'una gran heterogeneïtat. Hi ha un gran ventall de mutacions (unes 100) que es produeixen amb molt baixa freqüència (2-5% dels casos), mentre que només n'hi ha un reduït nombre que es produeixen amb una freqüència relativament més alta (10-15%)⁵. Aquest fet, juntament amb la falta de marcadors gènics específics de LLC⁴, dificulta la classificació i l'assoliment de conclusions sobre el seu valor pronòstic. Tanmateix, amb l'actual increment de l'ús de la tecnologia de *Next Generation Sequencing* (NGS) i l'ús d'eines bioinformàtiques avançades, aquesta complexitat hauria de deixar de suposar una limitació. El coneixement dels patrons mutacionals de cada pacient podria tenir una implicació molt important a nivell pronòstic i a l'hora d'escollir el millor tractament.

En primer lloc, la diferent evolució i pronòstic de la LLC, és a dir, la diferència entre una progressió lenta o una de més ràpida i agressiva, així com la freqüència d'unes mutacions o unes altres, sembla respondre a l'existència de dos subtipus moleculars diferents de la malaltia⁵. Aquests estarien caracteritzats per la presència d'un nombre major o menor de mutacions somàtiques en els gens d'*IGHV*, les quals són produïdes pel procés d'hipermutació somàtica (*Somatic Hypermutation*, SHM). Aquest és un procés fisiològic normal, i es produeix en els centres germinals dels fol·licles limfoides per tal de generar una gran varietat d'anticossos, amb afinitat pels diferents antígens a què pot estar exposat l'organisme. En la LLC, l'estatus dels gens d'*IGHV* indica l'origen de la malaltia (cèl·lules que han estat en el centre germinal del fol·licle o no), i comporta diferències biològiques i marques epigenètiques que varien segons si es tracta de cèl·lules B *naive* (*IGHV* no mutats) o de memòria (*IGHV* mutats)⁵.

Cap al 30-50% de pacients amb LLC no presenten mutacions en *IGHV*⁴. Les cèl·lules sense mutacions tenen una major inestabilitat genètica i un major risc d'adquirir mutacions desfavorables. Això fa que aquests pacients presentin uns períodes de temps abans de la primera intervenció més curts, així com una supervivència global (*Overall Survival*, OS) més curta. Malgrat que existeix una associació entre l'estatus mutacional d'*IGHV* i l'expressió de CD38 i ZAP-70, no s'hi ha trobat cap implicació terapèutica. D'altra banda, tot i que les diferents aberracions genòmiques pròpies de la LLC es poden produir en tots dos subtipus, les mutacions d'alt risc es troben més freqüentment en pacients amb *IGHV* no mutat⁵.

Breument, i ja comentat l'estatus d'*IGHV*, les alteracions genètiques més freqüents en LLC són les delecions en 13q (al voltant del 50% dels casos) i la trisomia 12 (al voltant d'un 20% dels casos). Menys freqüents són les delecions 11q (que afecten els gens *ATM* i *BIRC3*) i 17p (*TP53*), que destaquen més aviat per la seva rellevància clínica. Els gens més freqüentment mutats són *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, *ATM*, *BIRC3*, *POT1* i *MYD88* (3-15% dels casos) (**Figura 1**). Les

mutacions en *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53* i *BIRC3* es detecten amb més freqüència en els casos de recaiguda⁴.

Les diferents mutacions es poden classificar segons la via o funció amb la qual estan relacionats els gens afectats. Així, es poden trobar mutacions implicades bàsicament en les següents vies i mecanismes: senyalització Notch (*NOTCH1* i *FBXW7*); *splicing*, processat i transport de mRNA (*SF3B1*, *U2AF2*, *SFRS1*, *XPO1* i *DDX3X*); inflamació innata (*MYD88*, *TLR2* i *MAPK1*); control de cicle cel·lular i resposta a danys en el DNA (*ATM*, *TP53* i *POT1*); i finalment, senyalització Wnt. Les mutacions varien la seva freqüència depenent de si s'analitza LLC amb *IGHV* mutat o no. Així, se solen trobar associades a *IGHV* no mutat les mutacions en els gens *NOTCH1*, *SF3B1*, *XPO1* i *POT1*, mentre que associades a *IGHV* mutat es troben amb més freqüència *MYD88*, *CHD2* i *KLHL6*. D'altra banda, les mutacions relacionades amb la via Notch, transport de mRNA, i resposta a dany del DNA, es troben més freqüentment associades a *IGHV* no mutat, mentre que les mutacions relacionades amb inflamació innata s'associen més a *IGHV* mutat⁵.

Una de les alteracions genètiques que es té més en compte a l'hora d'establir un pronòstic és, tal i com s'ha comentat a l'apartat anterior, la deleció del gen *TP53*^{1,4,26}, que codifica per p53, una proteïna supressora de tumors de gran importància, entre d'altres, en la regulació de l'apoptosi^{27,28}. Tot i no ser de les mutacions més freqüents, és molt rellevant pel seu valor pronòstic, i la freqüència de mostres de pacients amb aquesta mutació és major fora dels casos de nou diagnòstic, ja que aquests pacients solen requerir seguiments i actualitzacions de tractament més freqüents⁵. Les delecions d'aquest gen es detecten per FISH, i determinen una major resistència a quimioteràpia i un pitjor pronòstic. El gen *TP53* està situat en el braç curt del cromosoma 17, així que, les delecions 17p, com les delecions i mutacions del mateix gen, també són pronòstiques d'una falta de resposta a tractaments amb agents alquilants i anàlegs de purines i s'associen a una supervivència més curta, de 2-3 anys^{1,5,26}.

La deleció 11q també és indicadora d'un pitjor pronòstic. La causa seria l'afectació dels gens *ATM* i *BIRC3*, implicats en la resposta a danys en el DNA i el control del cicle cel·lular^{4,5}. Aquesta alteració s'associa amb limfadenopatia i una ràpida progressió de la malaltia²³. El pronòstic d'aquesta alteració va millorar considerablement amb l'addició de rituximab al tractament de fludarabina combinada amb ciclofosfamida^{1,29}. Les mutacions en *ATM* també es poden produir sense que hi hagi deleció 11q³⁰. Pel que fa a les mutacions en *BIRC3*, són poc freqüents (4% al diagnòstic i 24% en LLC refractàries a la quimioteràpia), i confereixen un mal pronòstic, similar al dels pacients amb mutacions en *TP53*. *BIRC3* és un inhibidor de la via NFκB no canònica, de manera que la seva mutació o deleció va lligada a l'activació d'aquesta via^{5,30}.

La deleció 13q, en canvi, és l'alteració més comuna, i està associada a un pronòstic favorable si es presenta aïllada^{4,5}. Aquesta alteració afecta l'expressió de dos microRNAs, els miR15a i miR16-1, que s'ha vist que acceleren la proliferació de les cèl·lules B en modular l'expressió de determinats gens que controlen la progressió del cicle cel·lular³⁰. D'altra banda, també regulen

negativament *BCL-2* (*B-Cell Lymphoma 2*), així que aquestes mutacions resulten en una sobreexpressió de la proteïna BCL-2³¹.

Pel que fa a la trisomia 12, és força comuna i es troba present al voltant d'un 20% dels casos⁴. Tanmateix, els estudis realitzats fins ara han obtingut resultats diversos i la seva implicació en l'evolució de la malaltia encara és poc clara⁵. Està associada a un major risc de patir trombocitopènia, transformació de Richter o càncers secundaris, i sembla que els pacients amb aquesta alteració tindrien un risc intermig, amb una supervivència global que es trobaria entre la del pacients amb deleció de 13q i la dels pacients amb deleció de 11q o deleció de 17p³¹. La trisomia 12 estaria relacionada amb uns nivells d'expressió més elevats de diverses integrines i de molècules intracel·lulars senyalitzadores en la via de les integrines^{31,32}. A més, aquesta alteració està associada amb la presència de mutacions en *NOTCH1*^{31,32}.

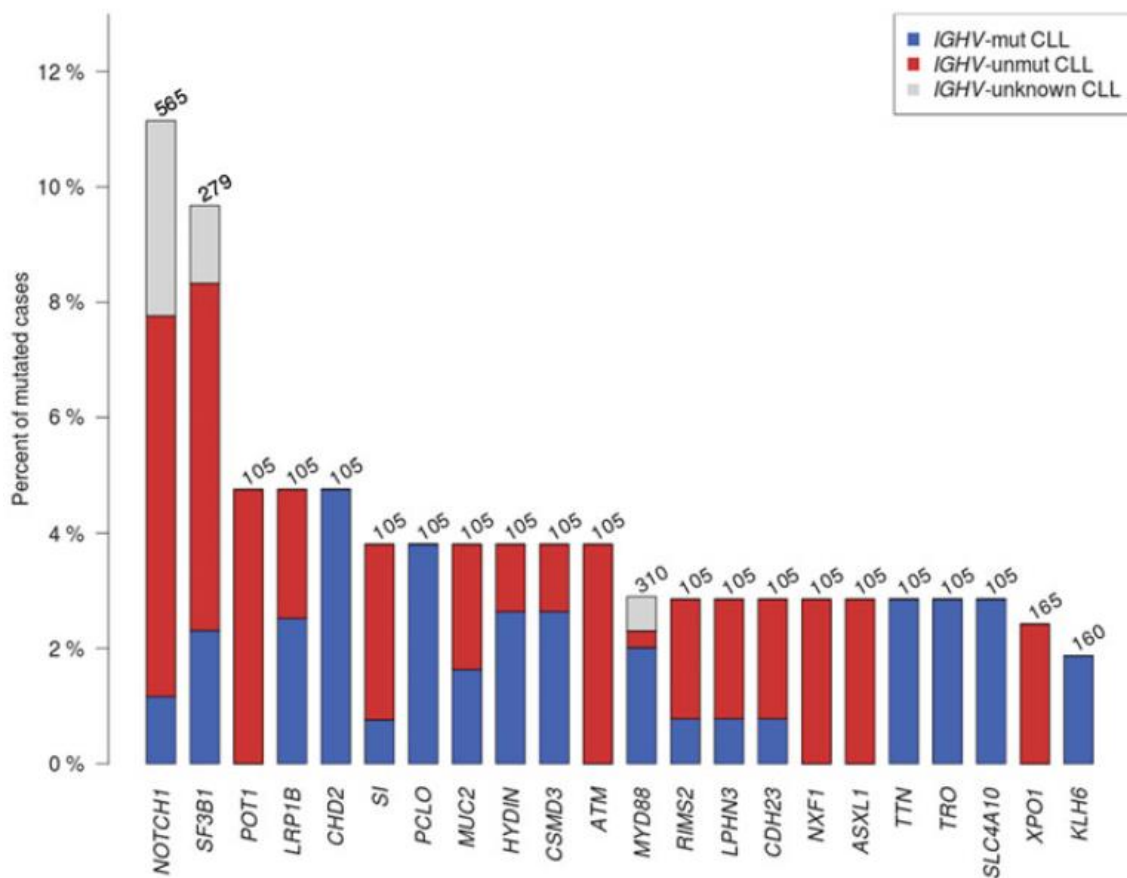


Figura 1: Histograma que il·lustra la freqüència de les mutacions més comunes en LLC, Martínez-Trillos et al., 2013⁶.

Pel que fa al gen *NOTCH1*, codifica per una proteïna transmembrana activada per lligand que participa en l'activació de la transcripció de diversos factors reguladors de la diferenciació cel·lular, proliferació i apoptosi. Les mutacions que es poden trobar en el gen *NOTCH1* són majoritàriament en el domini d'ubiquitinació, el que genera una proteïna truncada molt més estable i que deriva en una sobreexpressió de la mateixa⁵. Les mutacions de *NOTCH1* estarien associades a una malaltia més agressiva i a la resistència als

tractaments amb anti-CD20³⁰. Aquestes mutacions es troben amb més freqüència en pacients amb *IGHV* no mutat, alta expressió de ZAP-70 o alta expressió de CD38. Els pacients que les presenten també se solen trobar en estadis de Binet i Rai més avançats, i tenen nivells més elevats de lactat deshidrogenasa (LDH) i β -2 microglobulina. Els pacients amb aquestes mutacions, a més, tindrien una OS més curta, una supervivència lliure de progressió menor, requeriments més freqüents de tractament, més risc de desenvolupar resistència als tractaments, i un major risc de desenvolupar una transformació de Richter⁵.

A banda de les mutacions del gen, s'ha descrit que la senyalització NOTCH, de la qual forma part *NOTCH1*, és constitutivament més elevada en les cèl·lules de la LLC. De fet, es considera que és una via de gran importància i implicació en la patogènesi d'aquesta malaltia, ja que se sap que la sobreestimulació de la via amb lligands de NOTCH incrementa l'activació de NF κ B i la supervivència cel·lular, mentre que la inhibició accelera l'apoptosi espontània de les cèl·lules de la LLC³³. Implicades en la mateixa via NOTCH, però menys freqüents, es troben les mutacions en el gen *FBXW7*, que codifica per una ligasa d'ubiquitina encarregada de senyalitzar per a la seva destrucció al proteasoma diverses oncoproteïnes, entre elles, NOTCH1⁵.

Un altre mecanisme al qual poden estar associades les mutacions de LLC és l'*splicing*, processament i transport de mRNA. En aquest grup hi trobem, a banda d'altres menys freqüents, les mutacions en el gen *SF3B1*, que es detecten entre el 10 i el 15% de casos de LLC, sent el tercer gen més freqüentment mutat en la LLC, per darrere només de *NOTCH1* i *TP53*⁵. *SF3B1* és una proteïna filogenèticament conservada, amb dues regions definides, la N-terminal, hidrofílica i que conté motius d'unió de proteïnes; i la C-terminal, que és on s'han localitzat totes les mutacions en la LLC. La majoria de mutacions generarien canvis a la superfície interna de l'estructura de la proteïna. Encara que no es coneix bé la causa, les mutacions generarien l'activació de punts d'*splicing* 3' críptics⁵. Aquestes mutacions es troben més freqüentment en pacients amb malaltia avançada i característiques biològiques adverses, com ara nivells elevats en sèrum de β -2 microglobulina o *IGHV* no mutat. Independentment d'aquesta associació, aquestes mutacions conferirien un mal pronòstic, amb uns períodes de temps fins al progrés de la malaltia més curts i una supervivència global reduïda. D'altra banda, certs estudis indiquen que aquestes mutacions podrien estar associades amb resistència a la fludarabina^{5,30}.

A banda de *SF3B1* hi ha altres gens relacionats amb les subunitats de l'spliceosoma i la maquinària de transport de RNA que s'han trobat mutats en la LLC. En un estudi amb 140 pacients, es va observar que hi havia mutacions en aquests gens en un 31% dels casos³⁴. Aquestes mutacions, que en aquest estudi afectaven 30 gens diferents, generarien pautes de lectura alternatives, codons de terminació prematurs i pèrdua de punts de *splicing*. La implicació en la progressió de la LLC estaria poc clara³⁴. Tot i que són menys freqüents, també es poden trobar mutacions que afecten gens implicats en el transport de l'RNA, que sembla que podrien estar associades a *IGHV* no mutat. Tenint en compte que els pacients amb *IGHV* no mutat solen presentar una malaltia més agressiva, aquesta associació podria ser rellevant, ja que la modulació d'aquest mecanisme

mitjançant fàrmacs podria suposar una via alternativa de tractament per aquests pacients⁵.

Relacionat amb la inflamació innata, el gen *MYD88* codifica per una proteïna adaptadora indispensable per a la senyalització TLR (*Toll-Like Receptor*) de la IL-1, que té implicació en la producció de citocines proinflamatòries en resposta a la unió de diversos lligands de TLR. Aquesta via indueix l'activació de NFκB, i les LLC que tenen mutacions en *MYD88* mostren una elevada activació dels efectors *downstream* de STAT3 i de la subunitat p65 de NFκB. L'activació d'aquesta via produiria un reclutament de macròfags i limfòcits T, que crearien un microambient que afavoriria la supervivència de les cèl·lules de la LLC. La presència de mutacions en aquest gen és relativament infreqüent (2,7% dels casos), i s'ha trobat una associació amb LLC amb *IGHV* mutada i amb baixa expressió de ZAP-70 i CD38. D'altra banda, l'edat mitjana al diagnòstic dels pacients amb aquestes mutacions seria més baixa del normal, per sota dels 50 anys⁵.

A nivell epigenètic, en funció de les seves signatures de metilació, s'han identificat tres subgrups de LLC, que responen a diferents estadis de diferenciació de les cèl·lules leucèmiques. Així, distingim els casos que presenten cèl·lules *naive-like*, amb característiques semblants a les cèl·lules B *naïves*, que solen correspondre a malaltia amb *IGHV* no mutat i solen estar associats a un pitjor pronòstic; els casos que presenten cèl·lules *memory-like*, amb característiques de cèl·lules B de memòria, que solen correspondre a *IGHV* mutat i s'associen a un millor pronòstic; i els casos que presenten cèl·lules amb característiques intermitges, que solen tenir *IGHV* mutat però presenten un curs clínic més agressiu que els que presenten *memory-like*⁴.

A banda de les mutacions, un altre factor pronòstic a tenir en compte és l'expressió de ZAP-70, una tirosina cinasa citoplasmàtica que conferiria un pronòstic advers^{4,18,19}. La detecció d'aquesta proteïna es pot realitzar per diferents mètodes, com ara, per immunohistoquímica, per western blot o mitjançant citometria de flux. Ha estat descrit que els pacients amb més d'un 20% de cèl·lules positives per ZAP-70 presentarien uns períodes de temps més curts des del diagnòstic fins al moment en què requereixen tractament i unes taxes de supervivència menors³⁰.

Un altre factor pronòstic és CD38, una proteïna transmembrana present en les cèl·lules B, que actua promovent la supervivència i proliferació en les cèl·lules leucèmiques³⁰. El marcador CD38 confereix un pitjor pronòstic^{4,18,20}, l'expressió d'aquesta proteïna en més d'un 30% de les cèl·lules de LLC seria un predictor de taxes de resposta menors, un temps del diagnòstic a la primera teràpia més curt i una supervivència global menor. Tot i això, és un factor que pot variar al llarg de la malaltia, de manera que sol ser un indicador complementari³⁰.

Pel que fa a CD49d, també coneguda com a integrina alfa 4, és una proteïna implicada en l'extravasació, supervivència i activació dels leucòcits. En la LLC, el seu paper en la interacció de les cèl·lules leucèmiques amb l'estroma, a través de la unió a fibronectina, s'acaba traduint en una reducció de l'apoptosi, tant l'espontània com la induïda per fàrmacs^{35,36}. L'expressió a la superfície cel·lular

d'aquesta proteïna és indicadora d'un pronòstic advers, i s'associa amb una supervivència global i una supervivència lliure de tractament més curtes^{4,35-38}.

Pel que fa a la β -2 microglobulina, és una proteïna que es troba associada amb el complex d'histocompatibilitat principal de classe I (*Major Histocompatibility Complex*, MHC)²⁸. Els nivells elevats en sèrum d'aquesta proteïna s'han associat amb una malaltia més agressiva^{15,17}.

1.3. Tractaments

El tractament de la LLC varia en funció de les característiques de cada pacient. En estadis primaris no es recomana tractament, ja que diversos estudis han demostrat que la seva administració no millora el pronòstic, de manera que només es fa un seguiment periòdic per tal de seguir l'evolució de la malaltia^{1,18,39,40}. Es recomana la realització de recomptes cel·lulars de sang perifèrica i exàmens clínics cada 3-12 mesos¹.

En estadis més avançats, i només si la malaltia és activa i es presenta simptomatologia (síntomes B significatius, és a dir, febre, suors nocturnes o pèrdua de pes; citopènies no causades per autoimmunitat; símptomes de limfadenopatia, esplenomegàlia o hepatomegàlia; duplicació del nombre de limfòcits en menys de 6 mesos; anèmia autoimmune; trombocitopènia), es pot iniciar tractament.

El tractament de primera línia més comú, que se sol aplicar en pacients amb bon estat físic i sense *TP53* mutat o deletat, és FCR, que consisteix en fludarabina i ciclofosfamida, dos anàlegs de purines, en combinació amb rituximab, un tractament d'immunoteràpia basat en un anticòs monoclonal quimèric anti-CD20¹.

En pacients amb un bon estat físic i d'edat avançada, la teràpia FCR està associada a una major taxa d'infeccions severes en comparació al tractament amb bendamustina i rituximab (BR). Aquest és un tractament alternatiu que es pot considerar, tot i que produeix menys remissions completes que la combinació FCR. En pacients amb comorbiditats i sense *TP53* mutat, s'aconsella la combinació de clorambucil i immunoteràpia anti-CD20 (rituximab, ofatumumab o obinutuzumab)¹.

La combinació de rituximab amb el tractament original de fludarabina i ciclofosfamida va revertir notablement el pitjor pronòstic relacionat amb la deleció 11q^{1,29}. No obstant, en pacients d'alt risc, com els que tenen la deleció 17p o *TP53* mutat, el tractament FCR produeix una baixa resposta. Per a aquests pacients es recomana un tractament amb nous inhibidors, com ibrutinib o idelalisib, en combinació amb rituximab, seguit sempre que sigui possible per un transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC) al·logènica, si hi ha una bona resposta i el pacient es troba en bon estat físic^{1,41-43}. El transplantament pot aconseguir la remissió completa, encara que

no sempre es pot dur a terme, ja sigui a causa de determinats factors del pacient, riscos associats o per la dificultat per trobar un donant compatible. També es pot valorar la teràpia de manteniment, en pacients amb un major risc de recaiguda¹.

El 2016, la Food and Drug Administration (FDA), va aprovar l'ús del venetoclax, un inhibidor selectiu de BCL-2, per al tractament de pacients amb LLC amb deleció 17p⁴⁴. Més recentment, el venetoclax ha estat indicat també per al tractament de pacients sense la deleció 17p que hagin rebut, com a mínim, un tractament previ⁴⁴. L'acció del venetoclax és independent de l'estat de *TP53*, i genera bones taxes de resposta en monoteràpia⁴⁵.

En pacients en recaiguda o amb malaltia refractària, el tractament només s'hauria de començar a aplicar si hi ha símptomes. Molts pacients poden romandre molt de temps asimptomàtics sense necessitat de tractament després d'una recaiguda. A més, si la recaiguda es produeix passats almenys 24-36 mesos de la quimioteràpia i no hi havia alteració prèvia de *TP53*, es pot provar de tornar a aplicar el tractament de primera línia. Si la recaiguda es produeix en menys temps o si no hi ha resposta a la teràpia, cal canviar el règim terapèutic. Algunes opcions són els antagonistes de BCL-2 (sols o combinats), ibrutinib (inhibidor de cinases) o idelalisib (inhibidor de PI3K) combinats amb rituximab. Els pacients en bon estat físic que assolixen una segona remissió haurien de ser considerats per a sotmetre's a un transplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques¹.

Malgrat que sembla que podria augmentar la supervivència lliure de progressió, no està clar que el transplantament autòleg suposi una millora en la supervivència dels pacients de LLC en estadis avançats^{1,46}. El transplantament al·logènic s'hauria de considerar per pacients amb recaiguda primerenca, deleció de 17p o mutació de *TP53* que remetin amb inhibidors de cinasa o antagonistes de BCL-2, així com en pacients que no responguin a diverses línies de teràpia¹.

Com s'ha comentat prèviament, la transformació a limfoma de Hodgkin es pot tractar amb la quimioteràpia convencional per a aquesta malaltia i sol donar taxes de remissió llargues¹. Pel que fa a la transformació de Richter, té una resposta pobra a tractaments. Algunes de les teràpies disponibles són R-CHOP (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, i dexametasona (CHOP) més rituximab), rituximab més híper CVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina i dexametasona alternades amb metotrexat i citarabina) o OFAR (oxaliplatí, fludarabina, citarabina i rituximab). La resposta és generalment curta i pot ser aconsellable el transplantament en aquells pacients que compleixin els requisits¹.

A banda del tractament contra la mateixa LLC, els pacients poden requerir tractaments complementaris per les complicacions que es poden derivar de la leucèmia. En el cas de la citopènia autoimmune, els corticoesteroides poden donar bons resultats. Pels pacients que no hi responen, es pot administrar rituximab, i en cas que tampoc responguin, s'aconsellaria realitzar una esplenectomia¹.

Un altre problema recurrent són les infeccions, el que fa que sigui convenient limitar l'ús de corticoesteroides i d'altres agents immunosupressors.

L'administració d'immunoglobulina profilàctica sistèmica no té efectes negatius en els pacients, i es recomana en aquells que presentin infeccions recurrents o amb hipogammaglobulinèmia severa. La profilaxi antibiòtica, antiviral i antifúngica s'hauria d'administrar en pacients amb infeccions recurrents o amb un elevat risc de contraure'n. També es recomana la vacunació contra el pneumococ i la grip estacional¹.

Malgrat que els estudis són recents i en general compten amb cohorts reduïdes de pacients, sembla que la mortalitat per COVID-19 en pacients amb LLC se situaria al voltant del 30%^{47,48}. No s'ha determinat fins a quin punt aquesta elevada mortalitat seria causada directament per la malaltia, atès que els pacients amb LLC solen presentar altres factors de risc com l'edat i comorbiditats que tindrien un pes important en aquestes taxes. El fet de rebre tractament no va demostrar diferències en la mortalitat en comparació amb aquells pacients amb LLC als quals només se'ls realitzava un seguiment, sense l'administració de cap fàrmac. L'administració d'inhibidors de la tirosina cinasa de Bruton tampoc va demostrar cap influència en la mortalitat⁴⁸.

1.4. Cèl·lules mare leucèmiques

En alguns càncers i leucèmies, com ara la leucèmia mieloide crònica i la leucèmia mieloide aguda, s'ha descrit l'existència de poblacions de cèl·lules mare leucèmiques^{49,50}. Aquestes cèl·lules comparteixen moltes característiques amb les cèl·lules mare normals, com ara, la capacitat d'autorenovació, certa quiescència i la presència de mecanismes que les fan resistents a quimioteràpia, radioteràpia i altres estímuls externs que en poguessin induir l'apoptosi o la pròpia diferenciació cel·lular. Alhora, tot i que no necessàriament han de tenir unes taxes de proliferació molt elevades, sí que presenten una elevada capacitat d'autorenovació i de generar cèl·lules més diferenciades i amb majors taxes de proliferació que formen el gruix tumoral. Per tot plegat, aquestes cèl·lules serien les principals responsables de les recaigudes que es produeixen després del tractament, fins i tot quan hi ha hagut una aparent remissió completa. El romanent d'un nombre indetectable d'aquestes cèl·lules acabaria regenerant la malaltia al cap del temps, provocant la recaiguda una vegada interromput el tractament⁵⁰.

En la LLC se sol considerar que la malaltia ve donada més aviat per uns nivells d'apoptosi reduïts en les cèl·lules madures, que a més, anirien acumulant mutacions. No obstant, encara que hi ha molt pocs estudis al respecte i se'n desconeix la identitat exacta, també hi ha diferents evidències que apunten a l'existència de cèl·lules mare leucèmiques en la LLC⁵¹. D'aquesta manera, tot i que les cèl·lules de LLC són madures, totes tindrien l'origen en una població més indiferenciada, responsable de generar les cèl·lules de la LLC pròpiament dites, monoclonals i amb defectes en els mecanismes d'apoptosi.

Segons un estudi realitzat per *Kikushige et al.*⁵¹, l'origen de la LLC es podria trobar en les HSC. En primer lloc, l'estudi destaca el fet que la LLC no sempre és monoclonal, i que, d'altra banda, sol anar precedida d'un període més o menys prolongat de MBL, normalment asimptomàtic i caracteritzat per la presència persistent d'un nombre relativament elevat de limfòcits B, sense superar els 5000/ μ L en sang perifèrica. Els limfòcits B de la limfocitosi B monoclonal, malgrat el nom, pertanyen a més d'una clona en un 20-70% dels casos. Així, semblaria evident que en la progressió de la malaltia de MBL a LLC, a banda de l'increment en el recompte de limfòcits B hi hauria un fet determinant, que seria una tendència a la monoclonalitat⁵¹.

Realitzant un xenotransplantament de HSC de pacients amb LLC en ratolins, els investigadors del mateix estudi van veure que es produïen certes diferències en comparació a quan es trasplantaven HSC de donants sans, com ara, la producció d'un major percentatge de cèl·lules de llinatge B i la freqüent coexpressió de CD5 en els limfòcits B derivats d'aquestes HSC. Això indicaria que les HSC dels pacients de LLC són diferents de les d'individus sans. Tot i això, també van observar que el xenotransplantament de HSC de pacients de LLC generava característiques més pròpies de MBL que de LLC. Només les HSC de pacients van generar cèl·lules B clonals. A més, a diferència dels controls, les HSC de pacients van generar clons positius per CD5 i CD23, i un major nombre de cèl·lules B policlonals. Tot i això, analitzant la recombinació de VDJ, es va observar que les cèl·lules generades eren diferents de les dels pacients d'origen, i que no tenien els cariotips anormals propis de la LLC⁵¹.

Tot plegat porta a pensar que els orígens de la propensió a desenvolupar LLC es troben ja en les HSC, encara que no són suficients per generar la LLC; aquestes generarien un gran nombre de cèl·lules B, algunes de les quals podrien adquirir noves mutacions que serien determinants per la progressió de MBL cap a LLC⁵¹.

Tot i que la informació sobre l'existència de cèl·lules mare leucèmiques en la LLC sigui molt limitada, val a dir que la caracterització d'aquestes poblacions és difícil en general, també en altres leucèmies, així com quan es tracta de cèl·lules mare no leucèmiques, ja que la seva determinació per marcadors fenotípics presenta moltes limitacions. No hi ha gaires marcadors específics d'aquest tipus de cèl·lules^{50,52}, i molts dels que s'utilitzen per aïllar-les no semblen ser imprescindibles per a la seva funcionalitat⁵⁰. A més, molts d'aquests marcadors poden presentar variacions importants en funció de diversos factors, com ara l'estat d'activació o característiques de l'ambient en què es troben les cèl·lules^{50,53}. Alguns estudis, de fet, apunten que caldria considerar les cèl·lules mare com un població heterogènia definida per la funció, més que no pas com una entitat cel·lular específica, uniforme i caracteritzable per un fenotip o uns marcadors concrets⁵³. És per això que resulta essencial la cerca d'alternatives per a la identificació d'aquestes poblacions, com poden ser les anàlisis funcionals, que utilitzen la fisiologia de les cèl·lules en comptes de marcadors fenotípics per a la seva determinació⁵⁴⁻⁵⁷.

2. Apoptosi en la LLC

L'apoptosi, o mort cel·lular programada, és un procés pel qual la cèl·lula activa diferents mecanismes per entrar en una via de mort controlada. Aquesta mort pot estar induïda per factors diversos, com ara senescència o danys irreversibles en el DNA, i es produeix de forma ordenada, sense que la membrana cel·lular perdi la seva integritat ni es produeixi inflamació. Es diferencia així de la necrosi, procés patològic en què hi ha un dany tissular, en què les cèl·lules es trenquen i es produeix inflamació²⁸. Les cèl·lules que entren en apoptosi solen seguir un patró d'afectació que inclou l'arronsament i la condensació de la cèl·lula, el col·lapse del citoesquelet, la disgregació de l'embolcall nuclear, la condensació de la cromatina i la seva fragmentació, i finalment la disgregació de la cèl·lula en cossos apoptòtics²⁸. L'apoptosi és un mecanisme indispensable en processos com l'embriogènesi i la senescència i caiguda de flors i fulles en les plantes²⁸. De fet, apoptosi en grec significa "caiguda de la fulla". L'apoptosi també és indispensable per mantenir l'homeòstasi dels teixits, ja que en tots els òrgans és necessari que hi hagi un recanvi cel·lular per mantenir-ne el correcte funcionament²⁸.

En les cèl·lules tumorals, l'apoptosi sol estar reduïda, el que implica que les cèl·lules es multipliquin indefinidament i no morin malgrat patir alteracions genètiques, de manera que es produeix un creixement cel·lular desordenat i s'afavoreix l'acumulació de mutacions en el DNA. L'apoptosi és un mecanisme complex que es pot induir per diferents vies, i està regulat per molts gens, els quals poden actuar com a protooncogens si es veuen alterats per alguna mutació. Per tal com l'apoptosi és un element clau per entendre els processos tumorals i els mecanismes d'acció de molts tractaments, a continuació es presenten algunes de les vies i molècules més freqüentment implicades en el càncer, especialment aquelles més específiques que poden estar afectades en la LLC i sobre les quals està descrit que actua la curcumina, objecte d'estudi de la present Tesi Doctoral.

2.1. P53

La molècula p53, també anomenada "guardià del genoma", és una proteïna que actua com a supressora de tumors a través de diferents mecanismes moleculars²⁷. El gen que la codifica, *TP53*, es troba en el braç curt del cromosoma 17 (17p13). Té una funció indispensable per induir la resposta de la cèl·lula quan hi ha dany al DNA, aturant el cicle cel·lular si hi ha mutació. Si es produeix una alteració, es pot donar el cas que les cèl·lules amb certes mutacions no entrin en apoptosi i s'acabi desenvolupant un càncer. De fet, cap al 50% dels tumors humans tenen mutacions en *TP53*²⁷.

La p53 s'expressa constitutivament en tots els teixits, però els nivells són normalment baixos perquè es troba associada a MDM2, una ubiquïtina ligasa que promou la seva eliminació al proteasoma. Aquest procés pot disminuir si hi

ha dany al DNA o per altres senyals, fent que la p53 s'acumuli i produeixi diferents efectes, com la detenció del cicle cel·lular, en els punts de control G1/S o G2/M, ja que activa la transcripció de p21, un inhibidor de CDK; l'activació d'enzims de reparació del DNA; l'entrada en senescència, és a dir, la parada permanent i irreversible del cicle cel·lular; i l'activació d'apoptosi, en actuar com a promotor de gens proapoptòtics com ara *BAX* o en reprimir proteïnes antiapoptòtiques com *BCL-2* o *BCL-XL*²⁷.

Com s'ha comentat prèviament, les deleccions i mutacions de *TP53* són relativament freqüents en LLC, sobretot en pacients de risc o que han recaigut, i tenen una gran rellevància clínica, ja que confereixen un pitjor pronòstic a causa d'una progressió més ràpida de la malaltia i a que generen resistència al tractament amb fludarabina^{4,25,26}. Està descrit que la curcumina és capaç d'induir apoptosi en certs tipus de càncer en augmentar els nivells o sobre-regular l'expressió de p53⁵⁸⁻⁶², tot i que també està descrit que pot induir apoptosi independentment d'aquest factor⁶³⁻⁶⁵.

2.2. BCL-2

Quan la cèl·lula rep certs factors d'estrès, es pot activar l'apoptosi per mitjà de l'anomenada via intrínseca o mitocondrial, amb la qual s'activa una cadena de senyalització que acaba desembocant en la despolarització de la membrana mitocondrial i l'alliberament del citocrom C. Els noms d'aquesta via, mitocondrial i intrínseca, fan referència al paper central que ocupa el mitocondri, i al fet que es tracta d'una via que s'activa a nivell intracel·lular. Es diferencia així de la via extrínseca, que s'activa per senyals externs, mediat pels anomenats lligands i receptors de mort cel·lular, per induir l'apoptosi²⁸.

Les proteïnes *BCL* (*B-Cell Lymphoma*) són reguladores de la via intrínseca d'apoptosi, que actuen activant-la o inhibint-la. La proteïna *BCL-2* s'expressa a la membrana externa del mitocondri, on actua promovent la supervivència cel·lular. *BCL-2* actua conjuntament amb *BCL-XL* per inhibir *BAX* i *BAK*, dues proteïnes proapoptòtiques que promouen la permeabilització del mitocondri que comporta l'alliberament del citocrom C i d'espècies reactives de l'oxigen (*Reactive Oxygen Species*, *ROS*), iniciadors de la cascada d'apoptosi. La disminució de la relació *BCL-2/BAX* és la que determina que s'activi l'apoptosi. Aquesta relació està regulada per la p53^{28,60}.

La proteïna *BCL-2*, que és codificada pel gen *BCL-2* que es troba en el braç llarg del cromosoma 18 (18q21), està constitutivament sobreexpressada en LLC, i seria una de les causes de la sensibilitat reduïda a l'apoptosi i un factor pronòstic⁶⁶. La inhibició selectiva de *BCL-2* és el mecanisme d'acció pel qual indueix apoptosi en les cèl·lules de LLC el venetoclax, fàrmac utilitzat en pacients de LLC prèviament tractats, incloent aquells amb característiques de risc advers^{45,67}. Està descrit que la curcumina disminueix l'expressió constitutiva de *BCL-2* i *BCL-XL* alhora que té un efecte inductor sobre *BAX*^{58,60}.

L'activació de la via intrínseca comporta l'alliberament del citocrom c, una hemoproteïna hidrosoluble que forma part de la cadena de transport d'electrons del mitocondri, que en ser alliberada al citoplasma s'uneix a APAF1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*), una proteïna adaptadora activadora de procaspases. La unió del citocrom c i APAF1 forma l'apoptosoma, que uneix procaspasa 9, la qual és activada i passarà a activar altres caspases. Alhora, les proteïnes IAP (*Inhibitors of Apoptosis*) actuen inhibint les caspases, mitjançant la unió a aquestes i també promovent-ne l'eliminació als proteasomes, mentre que la proteïna mitocondrial DIABLO o SMAC (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*) s'uneix a les IAP i permet l'activació de les caspases i la progressió de l'apoptosi²⁸.

2.3. Caspases

Les caspases són proteases que constitutivament es troben en una forma inactiva o també anomenada zimogen, les procaspases, i que no s'activen fins que no són processades proteolíticament, arran de l'activació d'una via d'apoptosi. Són un element clau de la maquinària intracel·lular implicada en l'activació de l'apoptosi. Se'n distingeixen dos tipus, en primer lloc, les caspases apicals, iniciadores o *upstream*, són les caspases 2, 8, 9 i 10, encarregades d'iniciar la cascada d'activació; i en segon lloc, les caspases executores o *downstream*, que són les caspases 3, 6 i 7, efectores d'apoptosi. L'activació de les caspases comporta l'activació proteolítica de més procaspases i altres enzims, com les endonucleases, així com la proteòlisi de múltiples proteïnes com poden ser, per exemple, les laminines nuclears, que mantenen la integritat del nucli. Amb l'activació de la via intrínseca, la procaspasa 9, apical, es combina amb el citocrom c que ha estat alliberat del mitocondri i la proteïna APAF1 de l'apoptosoma i és activada. Llavors, la caspasa 9 activada, iniciarà l'activació de les caspases efectores. La caspasa 8, en canvi, està més relacionada amb l'activació de la via extrínseca²⁸.

Sembla que la resistència a l'apoptosi de la LLC no estaria causada per cap defecte de les pròpies caspases, sinó que l'activació d'aquestes estaria reduïda a causa d'una afectació de les vies intrínseca i extrínseca causada per altres factors *upstream*⁶⁸⁻⁷⁰. S'ha demostrat en diversos estudis que la curcumina pot augmentar l'activitat de les caspases, tant per la via intrínseca com extrínseca^{63,71-73}, encara que també s'ha descrit que pot induir apoptosi independent de caspases^{74,75}.

2.4. NOTCH

La via NOTCH és una via de senyalització força conservada en els organismes pluricel·lulars. Presenta els receptors NOTCH1-4 en mamífers. Els receptors de NOTCH són un complex heterodimèric compost d'un domini extracel·lular

receptor de lligands i d'un domini transmembrana i intracel·lular que actua de mediador de la senyalització. Quan el receptor rep un lligand, es produeix una proteòlisi del fragment intracel·lular, que es transloca al nucli per formar complexos de transcripció. El fragment intracel·lular té un domini que és fosforilat per a la ubiquitinització de la proteïna quan ja s'ha activat la transcripció^{5,76}.

La via NOTCH s'activa per contacte cèl·lula-cèl·lula, i està implicada en la regulació de múltiples processos de diferenciació i desenvolupament, tant en l'embrió com en l'adult. També està implicada en el manteniment de les cèl·lules mare, i en la regulació de la diferenciació, proliferació, supervivència i motilitat cel·lulars. Està implicada en la transcripció de diverses proteïnes, com ara p21, ciclina D, c-Myc o NFκB. A més, té implicació en la integració de vies com Wnt, SHH, Ras/Raf o NFκB, entre d'altres.

Aquesta via està constitutivament activa en la LLC, en comparació amb les cèl·lules B normals, i sembla que estaria implicada en les majors taxes de supervivència de les cèl·lules leucèmiques. A més, són relativament freqüents les mutacions en *NOTCH1*, que solen afectar el domini d'ubiquitinització, de manera que es produeix una proteïna de vida més llarga. Aquestes mutacions estan relacionades amb una malaltia més agressiva^{5,76}. Està descrit que la curcumina redueix la proliferació i indueix apoptosi en models cel·lulars de diversos càncers a través de la inhibició de la via NOTCH⁷⁶⁻⁸⁰.

2.5. NFκB

El factor nuclear NFκB és el complex proteic central d'una via que porta aquest mateix nom i que regula múltiples processos biològics com són la diferenciació cel·lular durant l'embriogènesi, la inflamació i la resposta immunitària, i la proliferació i la supervivència cel·lular⁷⁶. Es tracta probablement de la via inflamatòria més important i estudiada. Es comenta en aquest apartat perquè quan està sobreexpressada pot promoure la progressió del càncer, atès que molts dels factors inflamatoris que s'activen per aquesta via redueixen la sensibilitat a l'apoptosi de les cèl·lules tumorals⁸¹. A més, té un paper important regulant l'expressió d'una gran varietat de gens, la supervivència i la diferenciació en cèl·lules B⁸².

L'NFκB és un complex de factors de transcripció que està implicat en la regulació de múltiples gens proinflamatoris, que codifiquen per diferents citocines, quimiocines i molècules d'adhesió⁸³. Es troba ja sintetitzat a les cèl·lules, constitutivament inhibit per IκB, però en presència d'estímuls proinflamatoris, IκB és fosforilat per les cinases IKK, el que promou la seva ubiquitinització i l'alliberament de NFκB^{81,84}. En humans, les proteïnes que formen part del complex són p50/p105 (NFκB1), p52/p100 (NFκB2), p65 (RelA), c-Rel i RelB⁸².

L'NFκB és un factor clau en la patogènesi de la LLC i un potencial objectiu per a noves teràpies. Està constitutivament activat en la LLC, sobreregulant diferents gens anti-apoptòtics com *BCL2*, de manera que és una de les causes de de les

taxes d'apoptosi reduïdes de la malaltia. També causa una major resistència a les teràpies, intervén en la comunicació de les cèl·lules de LLC amb el microambient protector i està descrit que els nivells d'unió a DNA de la seva subunitat RELA s'associen amb períodes de temps del diagnòstic fins al primer tractament i OS més curts. La inhibició de NFκB induïx l'apoptosi de les cèl·lules de LLC *in vitro*, però sembla que *in vivo* hi hauria un efecte protector del microambient que caldria suprimir per mantenir aquest efecte^{82,85}.

La curcumina està àmpliament descrita com a inhibidora de NFκB^{58,59,86-89}. En tractar-se d'un factor de transcripció molt central en el metabolisme, la seva inhibició acaba traduint-se en un efecte generalitzat sobre diverses vies i molècules implicades en inflamació i oncogènesi⁹⁰.

2.6. Via Wnt

La via Wnt és una via de senyalització central en l'embriogènesi dels mamífers, però també en l'homeòstasi de teixits adults. Es troba regulant multitud de processos, com ara l'equilibri entre *stemness* i diferenciació, regulació del cicle cel·lular, proliferació, apoptosi, interaccions intercel·lulars, relació amb el microambient, adhesió, motilitat o migració cel·lular. També estaria relacionada amb l'hematopoesi, ja que té un paper important en la biologia de les HSC. D'altra banda, aquesta via es troba alterada en molts càncers i leucèmies⁹¹, i se sap que la seva activació aberrant té un paper important en l'oncogènesi⁹². Està estudiat que en la LLC diversos gens de la via estan sobreexpressats, i que això podria contribuir als nivells d'apoptosi reduïts i a la major supervivència de les cèl·lules leucèmiques⁹².

La senyalització de la via es produeix a través de la unió de les WNT, una família força extensa de glicoproteïnes secretades, amb els receptors FZD, el que genera cascades de senyalització força complexes dins la cèl·lula⁹². La via Wnt està composta per tres vies moleculars diferents, la canònica, o dependent de β-catenina, la Wnt/PCP (Planar Cell Polarity), i la Wnt/Ca²⁺⁹³. Tot i no ser tan coneguda com la Wnt/β-catenina, sembla que en les leucèmies de cèl·lules B madures, com la LLC, la branca amb més implicació seria Wnt/PCP, amb especial rellevància del co-receptor ROR1, un marcador força utilitzat per la detecció i seguiment de la LLC mitjançant citometria de flux, ja que no s'expressa en cèl·lules B madures normals⁹¹.

Està descrit que la curcumina pot inhibir la via Wnt/β-catenina en models cel·lulars de diversos càncers, reduint-ne així la proliferació i induint apoptosi^{59,94,95}.

2.7. JAK-STAT

La via JAK-STAT està implicada en la transducció de senyals, a partir de l'activació dels receptors que es produeix amb la unió de citocines i factors de creixement. Els receptors estan associats a les Janus Cinases (*Janus Kinases*, JAK), que fosforilen i activen les proteïnes reguladores de gens *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT), les quals passen llavors del citosol al nucli, on regulen la transcripció de certs gens.

Breument, la unió d'un lligand, com pot ser una citocina, al receptor, fa que aquest dimeritzi i les proteïnes JAK que hi estan associades s'acostin entre elles. Les proteïnes JAK es fosforilen mútuament en els residus tirosina, el que n'augmenta l'activitat cinasa. També es fosforila el receptor, creant-hi punts d'unió per dominis SH2. Això fa que s'hi uneixin les proteïnes STAT, que són fosforilades per JAK. Aquesta fosforilació causa la dissociació de STAT, que formaran homo o hetero dímers que es translocaran al nucli. La unió de proteïnes adaptadores pot facilitar la comunicació d'aquesta via amb altres, com la via MAPK²⁸.

La família de les proteïnes STAT està formada per un conjunt de molècules amb una important implicació en el desenvolupament d'òrgans i en la supervivència i proliferació cel·lular. STAT3 és un factor de transcripció que està implicat en la senyalització de citocines. La seva activació constitutiva ha estat descrita en molts tipus de càncer, sòlids i hematològics, incloent mama, carcinoma escamós de cap i coll, mieloma múltiple o càncer de pàncrees^{58,96-98}. En la LLC també està descrita l'activació constitutiva de STAT3, així com també la de STAT1, que estaria relacionada amb els nivells d'apoptosi reduïts, en activar la transcripció de gens de supervivència i proliferació^{96,99}.

Està descrit que la curcumina és capaç d'augmentar l'apoptosi o reduir el potencial metastàtic en diferents càncers a través de la modulació de la via JAK/STAT, gràcies en part a la reducció de l'activació de STAT3^{58,59,100-102}.

3. Resistència a fàrmacs

Les cèl·lules neoplàsiques poden mostrar una resistència incrementada als tractaments per mitjà de diversos mecanismes. Un dels múltiples sistemes d'evasió del càncer és el desenvolupament de resistència a fàrmacs (*Multidrug Resistance*, MDR) mitjançant l'extrusió dels fàrmacs fora de la cèl·lula per mitjà de bombes ATP (transportadors *ATP-binding cassette* (ABC)). Es tracta de proteïnes de membrana que actuen com a transportadors mitjançant hidròlisi d'ATP. Se'n coneixen 49 en humans, amb diferents nivells d'activitat, especificitat i localització, i es classifiquen en subfamílies que van de la A a la G¹⁰³.

El transportador ABCB1, més conegut com a glicoproteïna P (*P-glycoprotein*, P-gp), és el més estudiat. Es tracta d'una glicoproteïna de 1280 aminoàcids que pertany a la subfamília B1, i és codificada pel gen *ABCB1* (*MDR1*). Amb la unió d'ATP, aquesta proteïna pateix un canvi conformacional per generar un canal que permet l'extrusió de certs compostos fora de la cèl·lula¹⁰³. Alguns dels fàrmacs que es coneix que són extrudits per aquest transportador són les podofilotoxines (com l'etopòsid), la colquicina, els alcaloides de la vinca, els taxans o les antraciclins¹⁰⁴.

La curcumina actua reduint l'activitat de la P-gp^{103,105}, i produeix així una quimiosensibilització a certs fàrmacs, en augmentar-ne els seus nivells intracel·lulars. Aquest efecte podria ser causat per la pròpia estructura química de polifenol, amb múltiples grups hidroxil fenòlics que quedarien carregats en condicions fisiològiques i generarien múltiples ponts d'hidrogen i enllaços iònics amb proteïnes, de manera que es produiria un efecte pleiotròpic¹⁰³.

A la base de dades DrugBank¹⁰⁶ hi ha un registre de les diverses molècules que s'han descrit com a inhibidores de la P-gp. En molts casos es pot tractar parcialment d'una inhibició competitiva, és a dir, que la P-gp es veu inhibida en part perquè actua extrudint el compost en qüestió, i això disminueix la seva capacitat d'extrusió d'altres molècules. Alguns dels agents que s'han estudiat en la present Tesi Doctoral estan registrats com a substrat/inhibidor de la P-gp, com ara la curcumina, l'etopòsid, la colquicina, el venetoclax, la mitoxantrona i la doxorubicina. També figuren altres fàrmacs antineoplàsics com el tamoxifè, el paclitaxel, l'imatinib, l'idelalisib, la vinblastina i la vincristina, així com altres fàrmacs força coneguts com l'ibuprofè, l'omeprazol, la ciclosporina, el verapamil, la digoxina, la dexametasona, la prednisona, la progesterona o la testosterona, entre molts d'altres¹⁰⁶.

Malgrat que la rellevància de la P-gp en la LLC ha estat extensament estudiada, els resultats obtinguts han estat diversos i encara no hi ha consens sobre la importància clínica que tindria en la malaltia^{104,107,108}. Cal tenir en compte que l'expressió de la P-gp no és exclusiva de les cèl·lules leucèmiques, tot i que sí que sembla que en les cèl·lules de la LLC hi hauria una major activitat d'aquesta proteïna transportadora. D'altra banda, l'expressió de la P-gp en cèl·lules normals tampoc és uniforme, i sembla que hi hauria un augment de la seva expressió associat amb l'edat¹⁰⁸. Pel que fa a la seva implicació en la resposta als tractaments, tot i que els resultats també han estat dispersos, sembla que

aquells pacients amb més expressió de P-gp o en els quals aquesta no disminueix en realitzar el tractament, presentarien menys resposta a la quimioteràpia^{107,108}.

El següent transportador més estudiat és ABCG2, també conegut com BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*). Està implicat en la resistència a diversos agents antineoplàsics, com els derivats de la camptotecina, la mitoxantrona o la doxorubicina^{104,109}. Entre els inhibidors d'ABCG2 es troben el venetoclax i altres fàrmacs com la ciclosporina, l'imatinib, el dasatinib, el verapamil, l'omeprazol, l'estradiol, la dexametasona o la progesterona, entre molts altres¹¹⁰. La curcumina no figura com a inhibidor d'aquest transportador, ni cap dels fàrmacs testats en aquesta Tesi a excepció del venetoclax¹¹⁰. Tot i això, hi ha articles que apunten a que la curcumina sí que podria tenir un efecte inhibidor sobre aquest transportador^{111,112}. No hi ha gaire informació sobre la possible implicació d'aquesta proteïna en la LLC, tot i que està descrit que els seus nivells d'expressió en les cèl·lules de la LLC són relativament elevats, mentre que els limfòcits B normals pràcticament no l'expressen¹¹³.

Pel que fa al transportador ABCC1 (*Multidrug Resistance-associated Protein 1*, MRP1), està implicat en la resistència a etopòsid, i també és inhibit per la curcumina^{112,114}. L'ABCC1 es troba sobreexpressat en les cèl·lules de la LLC^{115,116}, i alguns estudis apunten a que els seus nivells serien més elevats en la LLC progressiva o refractària¹¹⁷, així com en pacients que han estat tractats amb fàrmacs que són transportats per la P-gp¹¹⁸, de manera que sembla que podria tenir una implicació important en la resistència a fàrmacs en la LLC.

Tot i no tractar-se directament de la curcumina, en un estudi es va descriure que el seu derivat tetrahidrocurcumina inhibia els transportadors de fàrmacs ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP o MXR) i ABCC1 (MRP1) en models cel·lulars de carcinoma cervical i càncer de mama. Aquest efecte semblava el responsable d'augmentar la sensibilitat de les cèl·lules a vinblastina, mitoxantrona i etopòsid¹¹².

4. Curcumina

4.1. Origen

La curcumina, també anomenada diferuloilmetà, és un compost fenòlic present en el rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*) i altres espècies de la família. La cúrcuma és una planta monocotiledònia de la família de les Zingiberàcies (**Figura 2 i Figura 3**), relativament propera al gingebre (*Zingiber officinale*). És nativa del sud-est asiàtic, i requereix un clima temperat, amb humitat ambiental, de manera que el seu cultiu a gran escala en molts països està relativament limitat, centrant-se sobretot en àrees de clima tropical^{119,120}. A més de la *Curcuma longa*, altres plantes filogenèticament properes contenen curcumina, com poden ser *Curcuma mangga*, *Curcuma zeodaria*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma xanthorrhiza* o *Zingiber cassumuna*⁶⁹. La cúrcuma té una concentració de curcumina d'unes 38888 ppm (al voltant d'un 3,9%)⁸⁷. D'altra banda, la cúrcuma també conté els curcuminoids demetoxicurcumina i bisdemetoxicurcumina, molt similars a la curcumina i amb una activitat farmacològica semblant, tot i que es troben en menors proporcions i no han estat tan extensament estudiats¹²¹⁻¹²⁴.

Regne: Plantae

Divisió: Magnoliophyta (Angiospermes)

Classe: Liliopsida (Monocotiledònies)

Subclasse: Commelínides

Ordre: Zingiberales

Família: Zingiberaceae

Gènere: *Curcuma*

Espècie: *Curcuma longa* L.

Figura 2: Taxonomia de Curcuma longa.

La cúrcuma (**Figura 4**) ha estat utilitzada des de l'antiguitat per la medicina aiurveda i xinesa i com a ingredient culinari de llarga tradició, tractant-se d'un dels ingredients indispensables del curri^{58,59}. Com a ús menys tradicional en gastronomia, es pot trobar com a colorant alimentari en molts productes d'alimentació, on s'etiqueta com a E100⁸⁷. En medicina, ha estat utilitzada tradicionalment per tractar problemes gastrointestinals, hepàtics, biliars i nerviosos, anorèxia, inflamació, dolor i problemes reumàtics, infeccions, constipats, asma, al·lèrgies, febres i per guarir ferides i problemes cutanis^{58,59,87,120}.

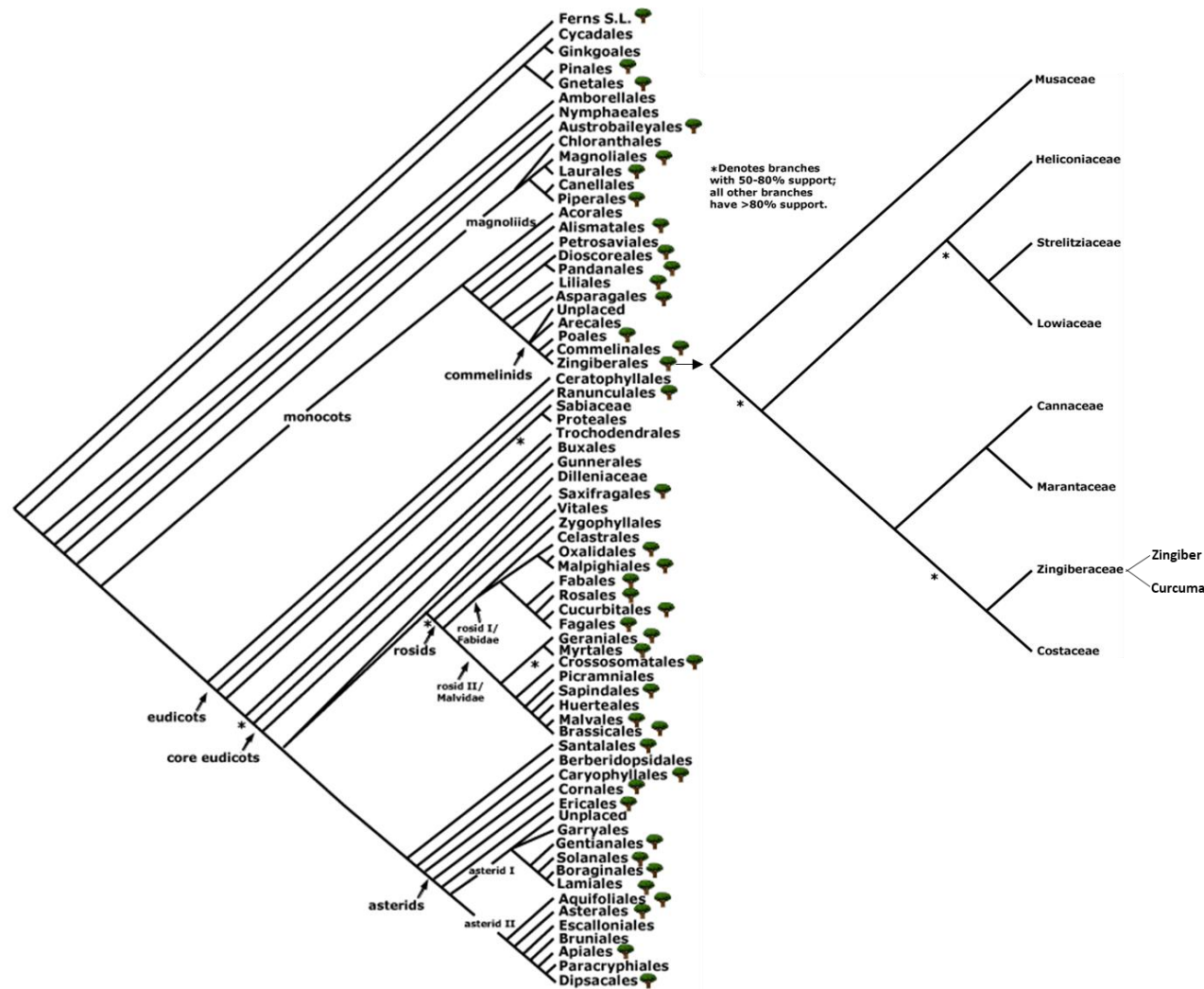


Figura 3: Filogènia de *Curcuma longa*. La cúrcuma pertany a l'ordre Zingiberales. Pertanyen a aquest ordre altres plantes tan conegudes com el gingebre (*Zingiber sp.*), el plàtan (*Musa sp.*), les aus del paradís (*Strelitzia sp.*), les cannes (*Canna sp.*) o l'helicònia (*Heliconia sp.*). Adaptat de Angiosperm Phylogeny Website.

Pel que fa a la curcumina, és una molècula amb efectes pleiotròpics, amb activitat antibacteriana, antimicrobiana, antiinflamatòria (important efecte inhibidor de la via NFκB), antioxidant, hipoglicèmica i cicatritzant, entre d'altres. Ha estat estudiada per tractar malalties com la proteïnúria, la mucositis, la depressió, alguns tipus d'esquizofrènia o el deteriorament cognitiu lleu. També hi ha estudis sobre el seu potencial clínic com a cardioprotector, trombosupressiu i anti-artrític^{59,59,87,88,120}.

En relació amb l'oncologia, la curcumina ha mostrat efectes positius en alguns tumors, amb acció sobre diverses vies de progressió del càncer, alta especificitat⁹⁰ i baixes taxes d'aparició de resistències. Un mecanisme d'acció important d'aquest compost sobre les cèl·lules canceroses és la reducció de les vies de supervivència i la inducció d'apoptosi. En canvi, no s'ha trobat toxicitat en humans a les dosis efectives¹²⁵, de manera que podria ser un compost adequat per tractar malalties cròniques. Per aquests motius, la curcumina es presenta com una opció adjuvant per combatre les cèl·lules leucèmiques i revertir la resistència a fàrmacs i les taxes d'apoptosi disminuïdes, afectant mínimament les cèl·lules normals. Val la pena remarcar que s'ha descrit que la curcumina assoleix un efecte tòxic a dosis molt menors en cèl·lules leucèmiques que en cèl·lules sanes⁹⁰. Alguns dels càncers pels quals s'ha estudiat la curcumina són el càncer colorectal, el càncer de pàncrees, el càncer de pròstata, el càncer de mama, el càncer de pulmó no microcític, el mieloma múltiple o la leucèmia mieloide crònica^{58,59,88}.



Figura 4: Il·lustració botànica de la cúrcuma (*Curcuma longa*), Köhler's Medizinal-Pflanzen.

4.2. Biosíntesi

Tot i que la ruta de síntesi dels curcuminoids i els gingerols es va començar a estudiar ja a la dècada dels 70, encara no es coneix amb total exactitud¹²⁶. Els precursors de la curcumina són una molècula de malonil-CoA (que forma la part central de la molècula) i dues de *p*-cumaroil-CoA (que formen els dos extrems). També està clara la importància de la via de síntesi fenilpropanoide, indispensable per generar el *p*-cumaroil-CoA. Per aquesta via, gràcies a l'enzim fenilalanina amoni liasa (*Phenilalanine Ammonia Lyase*, PAL), a partir de l'aminoàcid fenilalanina se sintetitza l'àcid cinàmic, que és un compost clau per a la síntesi de molts metabòlits secundaris, entre d'altres, les cumarines. En el cas de la curcumina, l'àcid cinàmic serveix per produir àcid cumàric, que al seu torn serveix per produir el *p*-cumaroil-CoA (**Figura 5 A**).

De forma general, dues molècules de *p*-cumaroil-CoA es condensen amb una de malonil-CoA, provinent de la ruta d'àcids grassos de cadena curta i mitjana, per formar la curcumina^{126,127}. No es coneix amb certesa quin enzim és el responsable de la síntesi final de la curcumina, tot i que sembla que seria una policètid sintasa. Tampoc està clar si la síntesi de curcumina es pot produir directament o el que es produeix és el precursor bisdemetoxicurcumina. La bisdemetoxicurcumina es produiria per la condensació de dues molècules de *p*-cumaroil-CoA amb una de malonil-CoA, per mitjà d'un enzim policètid sintasa, i posteriorment seguiria dos cicles seqüencials d'hidroxilació i *o*-metilació, per mitjà d'un enzim hidroxilasa i una *o*-metiltransferasa (OMT), per formar demetoxicurcumina i, seguidament, curcumina (**Figura 5 B**). Alternativament, el *p*-cumaroil-CoA es podria combinar amb àcid shikímic per acabar formant feruloil-CoA. Dues molècules de feruloil-CoA es podrien condensar amb una de malonil-CoA per mitjà d'una policètid sintasa per formar directament la curcumina (**Figura 5 B**).

Aquesta via de síntesi és molt propera a la que sintetitza els gingerols (**Figura 5 C**) en el gingebre (*Zingiber officinalis*), una planta filogenèticament molt propera a la cúrcuma. S'ha detectat una elevada activitat de la via fenilpropanoide en els teixits que acumulen curcuminoids i gingerols¹²⁶.

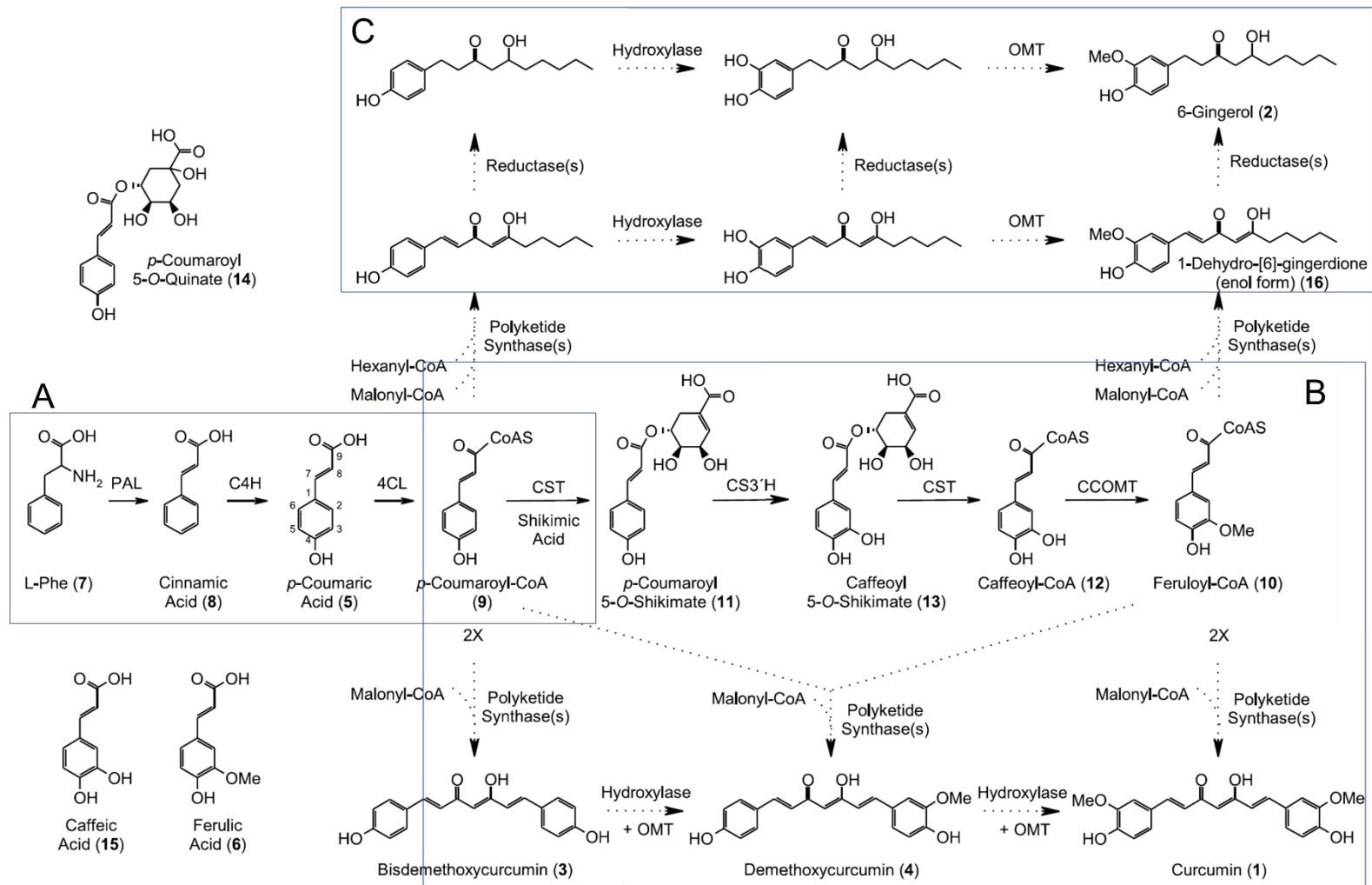


Figura 5: Via biosintètica de la curcumina, altres curcuminoides i gingerols, adaptat de Ramirez-Ahumada et al., 2006¹²⁶.

4.3. Propietats químiques i físiques

La curcumina és un polifenol, concretament un diarilheptanoid. Els diarilheptanoids estan compostos per dos anells aromàtics (grups aril) units per una cadena de set carbonis (heptà) (**Figura 6**). Els diarilheptanoids lineals, com la curcumina, també s'anomenen curcuminoides⁸⁷. A nivell bioquímic, la curcumina també es pot classificar com un alcà, un derivat de benzè, un catecol, un heptà, un hidrocarboni acíclic i un fenol⁸⁸. Té una massa molecular de 368,38 g/mol⁸⁷. La fórmula molecular de la curcumina és C₂₁H₂₀O₆, i la seva nomenclatura química és 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-diè-3,5-diona⁸⁷.

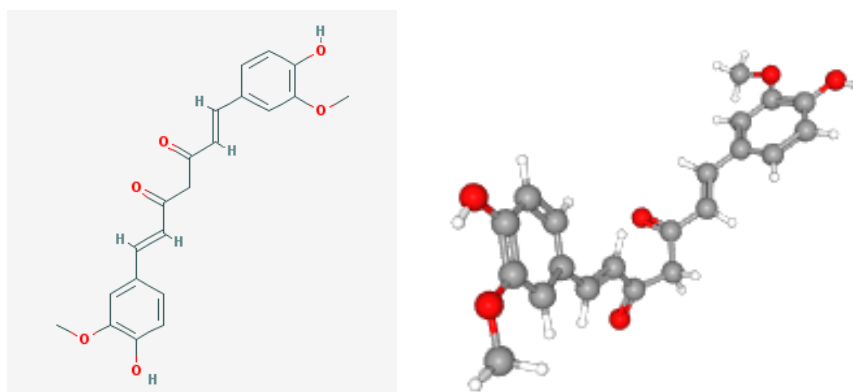


Figura 6: Estructura química de la curcumina, en format 2D i tridimensional, Pubchem.

La curcumina, que en estat pur es presenta com una pols composta per cristalls allargats, té una solubilitat molt limitada en solvents polars. En aigua té una solubilitat de 3,12 mg/L a 25 °C⁸⁷. En canvi, és soluble en àcid acètic i etanol (10 mg/mL¹). En dimetilsulfòxid (*Dimethyl sulfoxide*, DMSO), la solubilitat seria superior a 11 mg/mL. La curcumina és un compost estable a condicions d'emmagatzematge estàndards, i no consta com a fotolàbil⁸⁷.

La curcumina té un espectre d'absorció de la llum comprès entre 350 i 550 nm, amb un màxim situat entre 410 i 470 nm aproximadament^{128–131}, mentre que té un espectre d'emissió comprès entre 450 i 650 nm i amb un màxim entre 524 i 571 nm^{129–132} (**Figura 7**). L'emissió i l'absorció de la curcumina varien lleugerament en funció del solvent¹³⁰. És important tenir en compte els espectres d'absorció i emissió per a estudis per mitjà de citometria de flux i altres tecnologies que utilitzin fluorescència, ja que l'ús de la curcumina pot causar solapament amb els espectres d'emissió d'altres molècules i impedir l'obtenció de resultats vàlids. Pel seu rang d'absorció, les interferències es poden produir si s'utilitzen els làsers UV (350 nm), violeta (405 nm), blau (488 nm) i verd (532 nm). Bàsicament, els làsers que es poden utilitzar sense problemes de solapament quan es fa servir la curcumina són el groc/verd (561 nm) i el vermell (638 nm).

¹ Segons catàleg comercial Merck:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1386?lang=es®ion=ES>

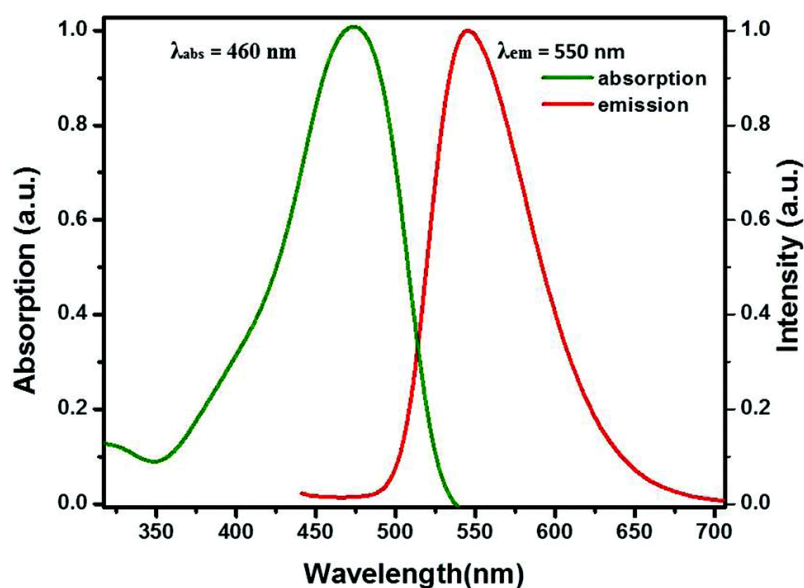


Figura 7: Gràfic dels espectres d'absorció i emissió de la curcumina en solució amb tetrahidrofurà, Ponnuel et al., 2016¹³¹.

4.4. Farmacologia

4.4.1. Farmacocinètica

Absorció

Un dels principals problemes que presenta la curcumina és la seva baixa biodisponibilitat. La curcumina s'absorbeix poc en administració oral, ja que té una absorció baixa al tracte gastrointestinal. En un estudi amb rates, una administració en monodosi de 2 g de curcumina va resultar en una concentració en plasma de menys de 5 µg/mL^{87,88}. Com una altra prova de la dificultat per arribar *in vivo* a les concentracions de curcumina que generen els resultats òptims *in vitro*, en un estudi clínic de fase I es van administrar fins a 8 g de curcumina per dia, quantitat que no generava efectes adversos i que es va administrar durant 3 mesos. La concentració pic mitjana assolida en plasma va ser al voltant de 1,77 µM, a les 1-2 hores de l'administració, i després va anar disminuint durant 12 hores¹²⁵.

La baixa biodisponibilitat de la curcumina també ve donada en part pel seu ràpid metabolisme al fetge i l'intestí. Segons un estudi realitzat amb rates i humans, la

co-ingestió de la curcumina amb piperina, un alcaloide del pebre que inhibeix la glucuronidació produïda en aquests òrgans, n'augmentaria la biodisponibilitat en un 2000%¹³³. Des de la data de l'estudi, realitzat el 1998, fins a l'actualitat, s'han realitzat múltiples estudis combinant curcumina amb piperina, a fi d'avaluar formulacions i presentacions que puguin optimitzar la biodisponibilitat de la curcumina¹³⁴⁻¹⁴⁰.

D'altra banda, el problema de la baixa biodisponibilitat de la curcumina també es pot reduir amb certes formulacions que n'augmenten l'absorció. A causa de la seva baixa solubilitat en aigua, la curcumina s'ha de presentar amb olis o altres solvents no polars. En els darrers anys s'han realitzat múltiples assaigs en què s'ha estudiat el benefici que pot suposar la presentació de la curcumina en diferents formulacions de liposomes o nanopartícules, obtenint en la majoria dels casos millores importants en l'absorció, l'estabilitat i la biodisponibilitat de la curcumina¹⁴¹⁻¹⁴⁵.

La curcumina té una pKa de 9,06⁸⁸. Segons *Hatcher et al.*⁵⁸, la curcumina tindria 3 protons ionitzables: un seria el protó enòlic, que tindria una pKa de 8,5, i els altres dos serien els protons fenòlics, que tindrien una pKa entre 10 i 10,5⁵⁸.

Distribució

No hi ha gaire informació sobre la distribució de la curcumina en l'organisme un cop absorbida. En un estudi realitzat amb rates, en què es van mesurar per colorimetria els nivells de curcumina en diferents teixits en un interval de temps entre 15 minuts i 24 hores després d'una administració oral de 400 mg, no es va poder detectar curcumina en sang del cor, el que indicava que els valors assolits eren inferiors a 0,5 µg/mL. Tot i que en nivells baixos, sí que es va poder detectar en sang portal, a concentracions menors de 5 µg/mL, i en fetge i ronyó, a concentracions de menys de 20 µg/g de teixit. L'absorció va ser al voltant d'un 60% de la dosi administrada¹⁴⁶.

En un altre estudi més recent, realitzat amb rates a les quals es va administrar una dosi oral de curcumina de 340 mg/kg, es va utilitzar cromatografia líquida de molt alta resolució (*Ultrapformance Líquid Chromatography*, UPLC) per detectar els nivells de curcumina en teixits, i espectrometria de masses per detectar-ne els metabòlits. Es va detectar una concentració de curcumina en plasma de 16,1 ng/mL, i en orina, de 2 ng/mL. El teixit on es va detectar més curcumina va ser en mucosa intestinal (1,4 mg/g), seguida de fetge (3671,8 ng/g), cor (807,6 ng/g) i ronyó (206,8 ng/g). Els metabòlits detectats van ser glucurònids fenòlics i alcoholics en plasma i orina; i productes de la reducció de la curcumina en el fetge¹⁴⁷. Aquests resultats expliquen en bona part l'important ús que ha tingut la cúrcuma tradicionalment per tractar problemes hepàtics i gastrointestinals, i que un dels càncers en què la curcumina ha presentat millors resultats sigui el de colon.

A nivell cel·lular, la curcumina és internalitzada per transport passiu tant en cèl·lules sanes com tumorals, però en major mesura en aquestes segones, i a

causa del seu caràcter lipofílic s'acumula especialment a la membrana cel·lular, seguida del nucli¹³⁰.

Metabolisme

La curcumina és metabolitzada de forma ràpida, ja a l'intestí, on es produeix O-conjugació per produir glucurònid de curcumina i sulfat de curcumina. També es produeixen altres metabòlits, per reducció, com la tetrahidrocurcumina, l'hexahidrocurcumina i l'hexahidrocurcuminol. A continuació, és metabolitzada al fetge, on es produeixen glucurònids de tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina i, en menor mesura, àcids ferúlic i dihidroferúlic. Aquests metabòlits s'excretarien per la bilis. Alguns d'aquests metabòlits conserven certa activitat farmacològica antioxidant i anti-inflamatòria⁸⁸.

Excreció

En un prova realitzada amb rates es va veure que el 75% de la curcumina administrada de forma oral s'eliminava amb la femta, mentre que a l'orina només s'hi van trobar traces. En un altre estudi es va determinar que un 60% es va absorbir, mentre que un 40% es va excretar sense canvis amb la femta. Amb la seva injecció per via peritoneal, un 73% es va expulsar per excreció fecal i un 11% per excreció biliar⁸⁸.

Paràmetres farmacocinètics

En un estudi en què es va avaluar la farmacocinètica de la curcumina en rates amb diabetis induïda per estreptozotocina, a les quals se'ls va administrar curcumina per via oral a una dosi de 500 mg/kg de pes o bé per via intravenosa (i.v.) a una dosi de 10 mg/kg, es va obtenir que la curcumina tenia una constant d'absorció de $0,29 \text{ min}^{-1}$. La concentració màxima assolida amb l'administració oral va ser de $0,06 \mu\text{g/mL}$, i es va assolir als 15 minuts. La biodisponibilitat va ser 0,47%, i el volum de distribució va ser de 37,49 L/kg en administració oral i de 10,63 L/kg en administració i.v. La vida mitjana va ser de 32,7 minuts en administració oral i de 8,654 minuts en administració i.v. Va presentar un aclariment de $0,85 \text{ L/kg/min}$, i una constant d'eliminació de $0,02 \text{ min}^{-1}$ en administració oral i de $0,08 \text{ min}^{-1}$ en administració i.v. (**Taula 2**)¹⁴⁸.

Taula 2: Valors dels diferents paràmetres farmacocinètics de la curcumina obtinguts en rates, adaptat de Gutierrez et al., 2015¹⁴⁸.

| Paràmetres farmacocinètics | Ruta d'administració | |
|--------------------------------|----------------------|--------------|
| | Oral | i.v. |
| k_{el} (1/min) | 0,02 ± 0,01 | 0,08 ± 0,02 |
| Vida mitjana (min) | 32,70 ± 12,92 | 8,64 ± 2,31 |
| AUC _{0-t} (µg/mL/min) | 1,89 ± 0,25 | 12,27 ± 2,75 |
| AUC _{0-∞} (µg/mL/min) | 2,97 ± 0,79 | 12,45 ± 2,72 |
| Cl (L/kg/min) | 0,85 ± 0,24 | 0,83 ± 0,19 |
| V_d (L/kg) | 37,49 ± 10,46 | 10,63 ± 4,10 |
| MRT (min) | 55,41 ± 20,19 | 12,46 ± 3,34 |
| k_a (1/min) | 0,29 ± 0,15 | - |
| C_{max} (µg/mL) | 0,06 ± 0,01 | 3,14 ± 0,90 |
| t_{max} (min) | 15,00 ± 0,00 | 5,00 ± 0,00 |
| F (%) | 0,47 ± 0,12 | 100 |

Paràmetres farmacocinètics després d'administració oral (500 mg/kg) i i.v. (10 mg/kg) de curcumina a rates amb diabetis induïda per estreptozotocina. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de la mitjana (n = 5).

K_{el} : constant d'eliminació; vida mitjana: temps de vida mitjana; AUC_{0-t}: àrea sota la corba de la concentració en plasma en funció del temps fins al darrer valor quantificable; AUC_{0-∞}: àrea sota la corba de la concentració en plasma en funció del temps extrapolat fins a infinit; Cl: aclariment; V_d : volum de distribució; MRT: temps de residència mitjà; k_a : constant d'absorció; C_{max} : concentració màxima; t_{max} : temps fins assolir la C_{max} ; F : biodisponibilitat.

4.4.2. Farmacodinàmica

Alguns dels efectes de la curcumina són com a analgèsic no narcòtic, anti-inflamatori no esteroïdic, antipirètic, inhibidor de plaquetes, inhibidor de la síntesi de prostaglandines (inhibidor de la ciclooxigenasa), antineoplàsic, antireumàtic, inhibidor de diferents enzims del complex citocrom P-450, colagog, inhibidor enzimàtic i inhibidor i substrat de la glicoproteïna P. També està descrit que produeix efectes sobre el sistema nerviós central i perifèric^{87,88}.

En relació a la leucèmia, la curcumina és un agent anticancerós i quimiopreventiu. També actua com a quimiosensibilitzador, afavorint que alguns càncers esdevinguin susceptibles a certs fàrmacs. Alguns dels mecanismes d'acció pels quals indueix aquests efectes són com a antioxidant, antiinflamatori o inhibidor de l'angiogènesi. També tindria efecte directament antitumoral, actuant com a inhibidor de múltiples enzims metabòlics i afectant així diverses vies i molècules relacionades amb la progressió del càncer⁸⁷.

L'efecte antiangiogènec, rellevant sobretot pel tractament i prevenció de la progressió de tumors sòlids, seria causat per la inhibició que produeix de molècules com FGF (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) i angiopoietina. A més, la curcumina també contribuiria a disminuir la capacitat metastàtica dels tumors en regular molècules d'adhesió com ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*), VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) i ELAM (*Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule*), així com diferents metaloproteïnases de matriu (*Matrix Metalloproteinase*, MMP)⁵⁸.

La curcumina actua també com a antiinflamatori potent, i en conseqüència, com a agent anticancerós afectant diferents molècules implicades en inflamació, senyalització de creixement, diferenciació i transformació maligna. Entre d'altres, inhibeix la ciclooxigenasa-2 (*Cyclooxygenase-2*, COX-2), i amb ella, la síntesi de prostaglandines. També actua inhibint diferents proteïna cinases i l'activació de c-Jun/AP-1^{58,59,88}, així com reduint la peroxidació de lípids i els nivells de múltiples citocines inflamatòries⁵⁸.

Un efecte molt important de la curcumina que actua com a antiinflamatori i antitumoral alhora, és la inhibició de NFκB. Aquest factor de transcripció, clau per iniciar la cascada inflamatòria, està sobreexpressat en molts càncers, on participa incrementant la quimioresistència, la proliferació i la resistència a l'apoptosi. Sembla, doncs, que aquesta seria una via clau per la qual la curcumina restableix la sensibilitat a l'apoptosi en alguns tumors i línies cel·lulars^{58,87}. Alhora, la inhibició de NFκB produïda per la curcumina exerciria un efecte molt selectiu, ja que al contrari del que s'observa sobre cèl·lules tumorals, s'ha vist que aquesta inhibició pot generar un efecte protector davant la citotoxicitat produïda per fàrmacs en cèl·lules no tumorals, com les de l'epiteli intestinal¹⁴⁹.

No es coneix per quina via la curcumina inhibeix NFκB, però sembla que podria ser el seu efecte antioxidant el que podria inhibir els intermediaris reactius de l'oxigen (*Reactive Oxygen Intermediates*, ROI), essencials per a l'activació de la via⁵⁸. D'altra banda, també està descrit que la curcumina redueix la fosforilació i consegüent degradació de IκB, molècula inhibidora de NFκB⁵⁸. Sigui com sigui, la inhibició de NFκB afecta una gran varietat de molècules, com són la COX-2, amb gran impacte inflamatori i implicada en la progressió de molts càncers; la ciclina D, reguladora del cicle cel·lular que pot actuar com a protooncogen i que es troba sobreexpressada en molts càncers; diferents molècules d'adhesió i MMPs; la sintasa induïble d'òxid nítric (*inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS), important font d'oxidació i inflamació implicada en molts càncers; les molècules de supervivència BCL-2 i BCL-XL, que inhibeixen l'inici de l'apoptosi per la via mitocondrial; i múltiples citocines com IL1, 2, 6, 8, 12, TNF o IFNγ⁵⁸.

La curcumina també actua inhibint directament altres proteïnes, enzims i vies metabòliques relacionades amb la iniciació i progressió de molts tipus de càncer. Inhibiria la via JAK-STAT, activada constitutivament en molts càncers, en reduir la fosforilació de STAT3 i en inhibir Akt. En reduir la inflamació que desencadena l'activació de JNK, també reduiria l'activació de la via MAPK, implicada en proliferació i diferenciació cel·lular i també afectada en molts càncers. La curcumina també té un efecte inhibidor sobre la via Wnt/β-catenina, així com

sobre EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). D'altra banda, la curcumina també podria augmentar els nivells de certes molècules, com PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Associated Receptor γ*), que actua induint diferenciació i reduint la proliferació cel·lular; o Nrf2, que activa múltiples molècules antioxidants i detoxificadores i seria eficaç per prevenir la iniciació del càncer. Finalment, també està descrit que la curcumina és capaç d'induir apoptosi en augmentar els nivells o sobre-regular l'expressió de p53⁵⁸⁻⁶².

La curcumina és un compost antioxidant, que actua com a segrestador d'espècies reactives de l'oxigen en els teixits i inhibeix la peroxidació de lípids i el dany en DNA induït per peròxid^{88,150}. Bona part d'aquesta capacitat ve donada per la seva estructura química, amb dos anells aromàtics, una unió de set carbonis i diversos enllaços insaturats, el que li permet cedir electrons^{87,151}. Alhora, la mateixa estructura química és la causa de dues propietats més de la curcumina, ja que li permet interactuar amb una gran varietat de biomolècules per unions covalents i no-covalents. Aquesta afinitat per diferents molècules, a més, és afavorida per la seva hidrofòbia, unions d'hidrogen i la flexibilitat del grup d'unió dels dos fenols. Així, d'una banda, la curcumina tindria una elevada afinitat pels grups tiol de les proteïnes, el que la faria un inhibidor enzimàtic d'ampli espectre, i de l'altra, actuaria com un agent quelant que permet reduir la toxicitat induïda per alguns metalls.^{87,151}

Tot i la seva capacitat antioxidant, la curcumina també pot actuar com un agent pro-oxidant, incrementant els nivells de radicals lliures i disminuint els nivells de glutatió. Aquest, de fet, seria un mecanisme pel qual sembla que la curcumina pot induir apoptosi i potenciar l'efecte d'alguns fàrmacs^{152,153}. A més, es tractaria d'un mecanisme selectiu, ja que afavoriria la toxicitat sobre les cèl·lules tumorals, les quals tenen de base uns nivells d'estrès oxidatiu augmentats a causa del seu metabolisme aberrant, mentre que pràcticament no tindria efecte sobre cèl·lules sanes, en les quals l'increment d'oxidació produït no assoliria uns nivells prou elevats com per generar danys i induir apoptosi^{87,152}.

A causa dels múltiples efectes descrits, que augmenten els nivells d'apoptosi de les cèl·lules tumorals, la curcumina actua com a quimiosensibilitzador, revertint la resistència a molts fàrmacs. Pel mateix motiu, també actuaria inhibint la carcinogènesi en diferents fases, com són la carcinogènesi induïda per agents químics, la promoció del tumor, el creixement del tumor i la proliferació de les cèl·lules tumorals i la progressió del càncer. A més, està descrit que la curcumina també pot actuar com a quimiopreventiu, és a dir, reduint el risc de desenvolupar certs tipus de càncer, com el de colon, estómac, i pell^{58,87}.

Per mecanismes similars als descrits, la curcumina produiria radiosensibilització de les cèl·lules tumorals, però també exerciria un efecte citoprotector sobre les cèl·lules no canceroses davant la radioteràpia. Aquest fet s'explicaria perquè d'una banda restaura els nivells d'apoptosi i redueix les vies de supervivència sobreexpressades en les cèl·lules tumorals, però alhora tindria un efecte antioxidant i antiinflamatori que reduiria els danys produïts en el teixit sa⁵⁸.

4.4.3. Toxicitat

Pràcticament no s'han registrat efectes adversos de la curcumina. En alguns casos podria produir efectes gastrointestinals adversos de poca gravetat^{87,154}. La curcumina està registrada a la base de dades DrugBank com a inhibidor del complex del citocrom P450 (CYP3A), central en el metabolisme hepàtic de molts fàrmacs^{88,105}, i s'ha descrit que pot elevar els nivells d'alguns enzims hepàtics, sense produir dany ni generar cap simptomatologia⁸⁷. En general, la curcumina no presenta toxicitat a les dosis utilitzades. Com s'ha comentat prèviament a l'apartat d'Absorció, en un estudi clínic de fase I es van administrar fins a 8 g de curcumina per dia, durant 3 mesos, sense generar efectes adversos¹²⁵. Una altra prova que la curcumina és ben tolerada de forma oral fins a aquesta dosi, és el cas clínic d'una dona de 57 anys amb mieloma múltiple en progressió després de tres recaigudes, que va estar prenent 8 g de curcumina complementada amb bioperina (piperina) en una única dosi oral als vespres en dejú durant almenys 5 anys (temps de seguiment reportat). Coincidint amb l'inici d'aquest tractament i en absència de cap tractament convencional, la malaltia es va estabilitzar i la dona va portar una bona qualitat de vida durant els 5 anys en què es va realitzar el seguiment¹⁵⁵.

En un estudi de toxicitat oral realitzat amb ratolins, la LD50 de la curcumina va ser major de 2000 mg/kg. Dosis orals de 1 a 5 g/kg no van mostrar efectes tòxics en rates⁸⁸. En un altre estudi realitzat amb rates i ratolins, en què es van avaluar possibles efectes adversos aguts (seguiment de 15 dies) i subcrònics (90 dies), no es van observar efectes tòxics que afectessin el comportament, pes, pes d'òrgans, paràmetres sèrics, hematològics, histològics, oftàlmics ni urinàlisi¹⁵⁶. Un altre estudi realitzat amb rates va determinar que la curcumina no exercia toxicitat reproductiva, i únicament la dosi més elevada utilitzada, de 10.000 ppm en la dieta, va produir una lleu reducció de la massa de la F2 (segona generació de cries)¹⁵⁷.

No s'han trobat interaccions adverses de la curcumina amb aliments⁸⁸. Fent una cerca de possibles interaccions amb fàrmacs a la base de dades DrugBank⁸⁸, la curcumina podria interaccionar amb diferents medicaments (910 registrats), augmentant-ne la concentració en plasma (com ara venetoclax, citarabina, etopòsid, paclitaxel...), o reduint-ne el metabolisme (ibrutinib, tamoxifè, ibuprofè...). Aquest efecte és coherent, tenint en compte que la curcumina interactua amb el complex del citocrom P-450, el que podria tenir implicació en el metabolisme de molts fàrmacs⁸⁸.

5. Fàrmacs

A continuació es fa una breu explicació dels fàrmacs que s'han estudiat en aquesta Tesi Doctoral, sols i combinats amb la curcumina, que han estat escollits per la seva importància en el tractament de la LLC (fludarabina, rituximab, ibrutinib, venetoclax), en el tractament d'altres leucèmies (etopòsid, citarabina) o perquè representen models adequats i ben estudiats de fàrmacs proapoptòtics (etopòsid, camptotecina, colquicina).

5.1. Etopòsid

Altres noms: VP-16, VePesid.

Massa molecular: 588,56 g/mol

Classificació: glucòsid, lignant, tetrahidronaftalè

Precaucions: mutagènic, evitar contacte amb la pell.

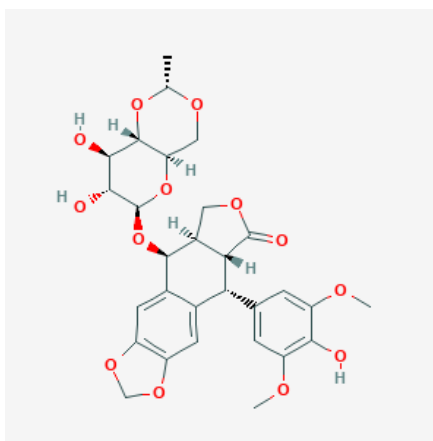


Figura 8: Il·lustració botànica de *Podophyllum peltatum*, Köhler's Medizinal-Pflanzen. Estructura química de l'etopòsid, Pubchem.

L'etopòsid és un glucòsid inhibidor de la DNA topoisomerasa II. Es troba present en el podofil (*Podophyllum peltatum*)¹⁵⁸ (**Figura 8**), una planta de la família de les Berberidàcies i l'ordre Ranunculals. És originària d'Amèrica del Nord, on havia estat utilitzada ja pels pobles nadius per tractar berrugues víriques i també com a emètic i purgant potent. És una planta de boscos caducifolis humits, que brota i floreix a la primavera, quan els arbres encara no han tret fulla, i fructifica i mor a principis d'estiu^{159,160}.

L'etopòsid és un derivat semisintètic de la podofiltoxina, l'extracte del podofil. La inhibició de la topoisomerasa II produïda per l'etopòsid impedeix el relligament de la doble hèlix de DNA, de manera que quan aquest es replica s'acumulen tensions i es generen ruptures en la molècula. Com a conseqüència, s'acaba

induïnt un bloqueig del cicle cel·lular, principalment en les fases G2 i S, i l'apoptosi de les cèl·lules^{158,161}.

Actualment, l'etopòsid s'utilitza en la pràctica clínica per tractar tumors testiculars refractaris i el càncer de pulmó de cèl·lula petita, així com el limfoma, el glioblastoma multiforme i la leucèmia mieloide aguda. També està indicat, sol o en combinació amb altres agents antineoplàsics, pel tractament del limfoma de Hodgkin de segona línia, del limfoma no-Hodgkin refractari o en recaiguda, leucèmia mieloide aguda refractària o en recaiguda, leucèmia limfoblàstica aguda, mieloma múltiple, neuroblastoma, càncer d'ovari, carcinoma adrenocortical, carcinoma gàstric i hepatoblastoma^{158,161}.

5.2. Camptotecina

Massa molecular: 348,358 g/mol

Classificació: alcaloide

Precaucions: toxicitat oral potent, pot causar defectes genètics en cèl·lules germinals.

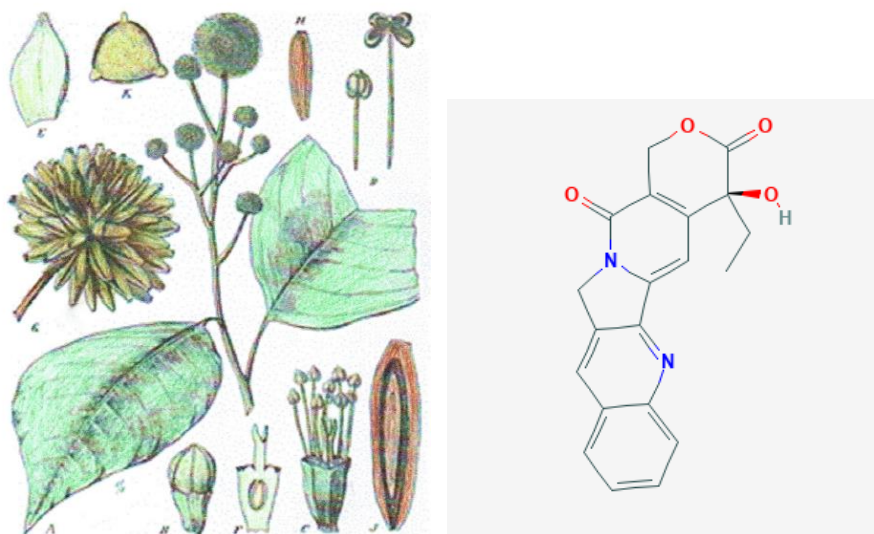


Figura 9: Il·lustració botànica de Camptotheca acuminata, adaptat de Das Pflanzenreich 220 (1910). Estructura química de la camptotecina, Pubchem.

La camptotecina és un alcaloide inhibidor de la DNA topoisomerasa I. S'ha estudiat pel tractament d'alguns tipus de càncer, com el de colon, el de mama i el de pulmó de cèl·lula petita. Tot i que té una activitat antineoplàsica potent, té una baixa solubilitat i bastants efectes adversos, de manera que no s'utilitza en tractaments^{162,163}, mentre que sí que s'utilitzen derivats com el topotecan i l'irinotecan. La inhibició de la topoisomerasa I, que té una funció semblant i complementària a la topoisomerasa II, comporta l'acumulació de tensions i trencaments en la doble hèlix de DNA en la fase S. La camptotecina s'obté de

l'escorça i les fulles de l'arbre *Camptotheca acuminata* (**Figura 9**), originari de la Xina¹⁶³, de l'ordre Cornals i la família Cornàcies.

L'irinotecan és utilitzat per tractar el càncer colorectal i el càncer de pàncrees en estadis avançats^{164,165}, mentre que el topotecan és utilitzat per tractar el càncer d'ovari en estadis avançats després de recaiguda o progressió, com a tractament de segona línia en càncer de pulmó de cèl·lula petita o en combinació amb cisplatí per tractar càncer de cèrvix recurrent o persistent¹⁶⁶.

5.3. Colquicina

Massa molecular: 399,437 g/mol

Classificació: alcaloide

Precaucions: molt tòxica per via oral, dosi letal en humans al voltant de 5 mg/kg. Pot provocar irritació en contacte amb la pell.

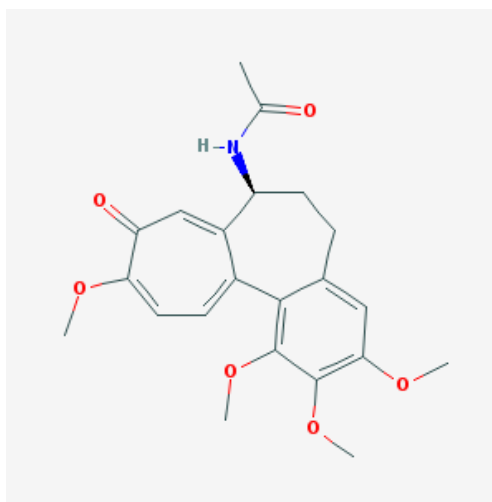


Figura 10: Il·lustració botànica de *Colchicum autumnale*, Köhler's Medizinal-Pflanzen. Estructura química de la colquicina, Pubchem.

La colquicina és un alcaloide isoquinolínic, inhibidor de la polimerització de microtúbuls a causa de la seva unió a la tubulina, que en conseqüència, inhibeix la mitosi¹⁶⁷. Es troba present en plantes del gènere *Colchicum* (Lilials, Colchicaceae), sobretot en el còlquic (*Colchicum autumnale*) (**Figura 10**). El còlquic es troba present en prats humits de muntanya de tot Europa, i ja era utilitzat en l'antiguitat per tractar la gota, malgrat la seva toxicitat. La colquicina s'utilitza per tractar la febre mediterrània familiar, i ha estat investigada com a potencial tractament per la pericarditis, l'infart de miocardi i la nefropatia diabètica¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Aquestes aplicacions s'expliquen per les seves propietats antiinflamatòries, ja que en inhibir la polimerització de microtúbuls disminueix l'activitat i migració/quimiotaxi de leucòcits i la capacitat fagocítica¹⁶⁷. Més

recentment, ha tingut un ús molt important per a l'obtenció de cariotips en l'anàlisi citogenètica. La inhibició de la polimerització de microtúbuls fa que les cèl·lules que entren en divisió quedin retingudes en les fases inicials de la mitosi (metafase i anafase) i acabin morint.

Se n'ha estudiat el potencial per tractar o prevenir el càncer, però, tot i que presenta efectes prometedors, produeix importants problemes de toxicitat que a la pràctica en limiten el seu ús terapèutic¹⁷⁰⁻¹⁷³. A més, presentaria limitacions per arribar a generar una remissió completa, lliure de recaigudes¹⁷⁰.

La colquicina interacciona, com a substrat i inhibidor, amb el transportador de fàrmacs glicoproteïna P^{167,168}, i amb el complex del citocrom P450 3A4 (CYP3A4)^{167,168,174}, que està implicat en el metabolisme i eliminació d'aquest i molts altres fàrmacs. Els principals efectes de toxicitat que pot produir són insuficiència renal, efectes neuromusculars i miopatia, que apareix per efecte acumulatiu amb tractaments prolongats. A nivell hematològic pot produir mielosupressió, leucopènia, granulocitopènia, trombocitopènia i pancitopènia. La combinació amb macròlids, que també inhibeixen la glicoproteïna P i el citocrom P450, suposa un risc de causar pancitopènia greu¹⁶⁷.

La colquicina s'absorbeix ràpidament per via oral. L'eliminació és via excreció renal i biliar, amb certa recirculació enterohepàtica de la colquicina que se secreta intacta. La glicoproteïna P tindria un paper imprescindible en l'excreció biliar del fàrmac, mentre que els enzims del complex citocrom P450 tindrien un paper important en el seu metabolisme^{167,168}.

5.4. Citarabina

Altres noms: Ara-C, arabinòsid de citosina, cytosar

Massa molecular: 243,219 g/mol

Classificació: arabinonucleòsid, nucleòsid de pirimidina

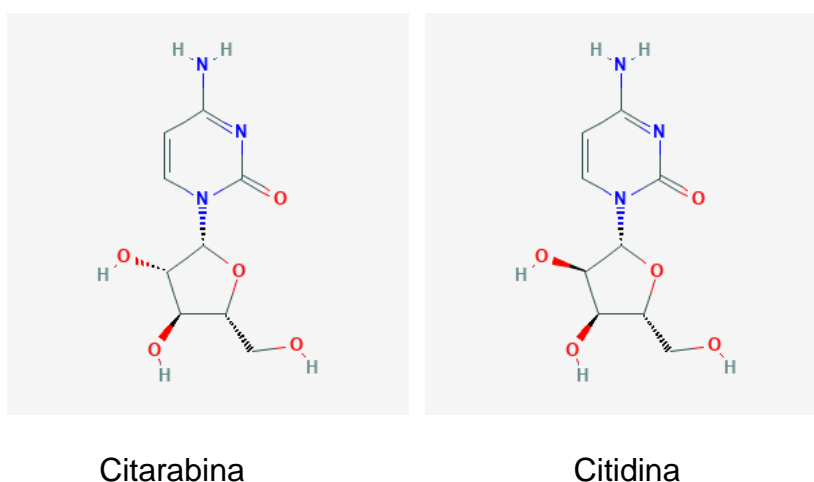


Figura 11: Estructura química de la citarabina i la citidina, Pubchem.

La citarabina és un anàleg de nucleòsid de pirimidina, concretament de la citidina, que conté arabinosa en comptes de ribosa (**Figura 11**). Actua com un antimetabòlit, és a dir, com un inhibidor metabòlic, que inhibeix la síntesi de DNA. A l'interior cel·lular, la citarabina experimenta una ràpida conversió a la forma trifosfat i competeix amb la citidina per la incorporació al DNA. La seva estructura química fa que, un cop incorporada al DNA, comprometi la rotació de la doble hèlix i n'aturi així la replicació, bloquejant les cèl·lules en fase S. D'altra banda, la citarabina també actua inhibint l' α - i la β -DNA polimerasa, inhibint així la replicació i la reparació del DNA¹⁷⁵.

La citarabina s'aïlla del fong basidiomicet *Xerocomus nigromaculatus*. S'utilitza sobretot per tractar les leucèmies mieloide aguda, mieloide crònica, limfoblàstica aguda i la infiltració meníngia per leucèmia. També té efectes antivirals i immunosupressors¹⁷⁵. Hi ha alguns estudis que indiquen que la citarabina podria ser útil combinada amb altres fàrmacs per tractar la LLC en recaiguda o refractària, així com la transformació de Richter¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

La citarabina s'ha d'administrar per via intravenosa, intratecal, subcutània o intramuscular, ja que la seva absorció al tracte gastrointestinal és inferior al 20%¹⁷⁹. Produeix mielotoxicitat i pot produir una depressió medul·lar potent. Com a conseqüència, hi ha un augment significatiu en el risc d'infeccions. Pot afectar a la fertilitat i causar malformacions en el fetus. També pot produir danys en el teixit conjuntiu, que poden generar miàlgia, febre, dolor ossi i articular i conjuntivitis¹⁷⁵.

5.5. Fludarabina

Massa molecular: 285,235 g/mol

Classificació: nucleòtid fluorinat, anàleg de purina

Precaucions: irritant. Toxicitat aguda si s'ingereix.

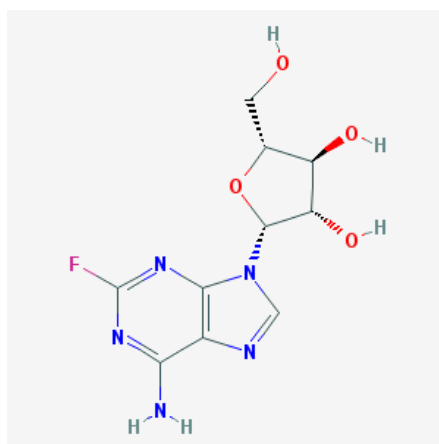


Figura 12: Estructura química de la fludarabina, Pubchem.

La fludarabina (**Figura 12**) és un nucleòtid fluorinat, anàleg de purina, que actua com a antimetabòlit, amb activitat antineoplàsica a través de la inhibició de la síntesi d'àcids nucleics. S'administra per via parenteral en forma de fludarabina fosfat. La fludarabina fosfat es defosforila i a l'interior cel·lular torna a ser fosforilada i es produeix 2-fluoro-ara-ATP. Aquest metabòlit inhibeix l' α -DNA polimerasa, la ribonucleòtid reductasa i la DNA primasa, interrompent així la síntesi de DNA¹⁸⁰.

La fludarabina s'utilitza pel tractament de la LLC, normalment en el tractament de primera línia combinada amb rituximab i ciclofosfamida, el que es coneix com a règim FCR. També s'utilitza com a part de règims immunosupressors utilitzats per al condicionament pel transplantament de progenitors hematopoètics¹⁸⁰.

Com a efectes adversos, la fludarabina genera immunodepressió. En alguns casos pot produir hepatotoxicitat, tot i que és poc freqüent. A causa de la immunosupressió que produeix, és més habitual la reactivació de l'hepatitis B crònica¹⁸⁰.

5.6. Rituximab

Altres noms: Rituxan, MabThera[®]

Massa molecular: -

Classificació: anticòs monoclonal, quimèric (muri/humà), IgG1 κ



Figura 13: Estructura secundària del rituximab, DrugBank.

El rituximab (**Figura 13**) és un anticòs monoclonal, quimèric murí/humà, dirigit contra CD20. La unió al CD20, antigen de superfície dels limfòcits B, indueix una eliminació selectiva d'aquests a través de lisi, sembla que per citotoxicitat mediada per complement (*Complement-Dependent Cytotoxicity*, CDC) o per citotoxicitat dependent de complement mediada per cèl·lules (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC)¹⁸¹. S'utilitza des de 1997, any en què va

ser aprovat per la FDA per tractar pacients amb limfoma no-Hodgkin. En la LLC se sol utilitzar en combinació amb fludarabina i ciclofosfamida (FCR)¹⁸². El seu ús en combinació amb el tractament original de fludarabina i ciclofosfamida va suposar una millora en el pronòstic dels pacients amb deleció 11q^{1,29}.

A més de la LLC, el rituximab també s'utilitza per tractar limfomes de cèl·lules B, així com malalties autoimmunes com l'artritis reumatoide, l'esclerosi múltiple, la diabetis tipus I, la granulomatosi amb poliangitis (granulomatosi de Wegener) o la poliangitis microscòpica. També s'utilitza en alguns casos per reduir el rebuig en alguns transplantaments d'òrgans, com ara, el de ronyó^{181,182}.

El rituximab és una IgG1 kappa, que conté les seqüències de les regions variables d'immunoglobulina (*Fragment antigen-binding*, Fab) de ratolí i la seqüència de la regió constant (*Fragment crystallizable*, Fc) d'humà¹⁸².

5.7. Ibrutinib

Altres noms: Imbruvica

Massa molecular: 440,507 g/mol

Classificació: acrilamida

Precaucions: irritant (evitar contacte amb pell i ulls), toxicitat oral aguda

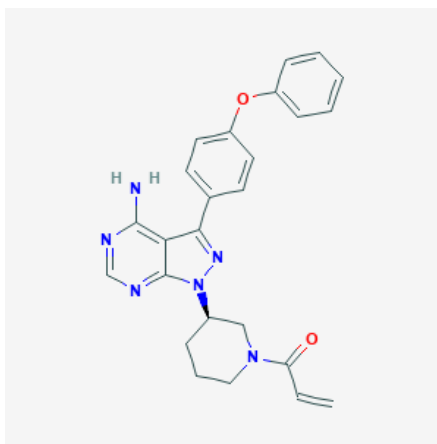


Figura 14: Estructura química de l'ibrutinib, Pubchem.

L'ibrutinib (**Figura 14**) és una acrilamida, d'administració oral, que actua com a inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (*Bruton's Tyrosine Kinase*, BTK), per unió covalent irreversible. La BTK té un paper clau en la maduració dels limfòcits B, i es troba sobreexpressada en molts càncers de cèl·lula B, als quals confereix una major supervivència i proliferació cel·lular. La inhibició que produeix l'ibrutinib impedeix l'activació dels limfòcits B, així com la senyalització que medien, i condueix a una inhibició del creixement de les cèl·lules B malignes que sobreexpressen BTK¹⁸³.

L'ibrutinib s'utilitza per tractar la LLC refractària, en pacients que hagin rebut prèviament una altra teràpia. Està indicat per pacients amb deleció de 17p. Es pot administrar sol o en combinació amb rituximab i bendamustina. També s'utilitza per tractar el limfoma de cèl·lules de mantell i la macroglobulinèmia de Waldenström¹⁸³.

Com a efectes secundaris, pot produir mielosupressió, hepatotoxicitat en alguns casos, reactivació del virus de l'hepatitis B, i un major risc de contraure infeccions¹⁸³.

5.8. Venetoclax

Altres noms: Venclexta

Massa molecular: 868,447 g/mol

Classificació: pirrolopiridina, oxà, nitrobenzè, molècula petita

Precaucions: irritant

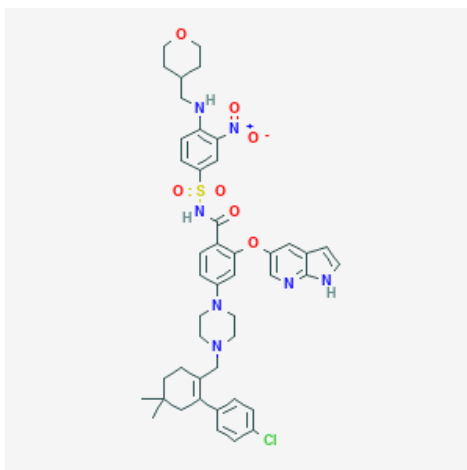


Figura 15: Estructura química del venetoclax, Pubchem.

El venetoclax (**Figura 15**) és un fàrmac d'administració oral, que actua com a inhibidor selectiu de BCL-2. El BCL-2 és una proteïna anti-apoptòtica, que està sobreexpressada en certs tipus de càncer, conferint una resistència a fàrmacs augmentada i una major supervivència de les cèl·lules tumorals. En inhibir BCL-2, el venetoclax indueix apoptosi, produint un efecte antineoplàsic⁶⁷.

El venetoclax s'utilitza en pacients que han estat prèviament tractats, amb LLC refractària o amb deleció de 17p. És molt selectiu, la seva acció és independent de l'estat de *TP53* i genera bones taxes de resposta en monoteràpia⁴⁵. Té una activitat immunosupressora potent, i pot causar la reactivació de l'hepatitis B. S'ha d'evitar la seva administració durant l'embaràs, ja que pot produir danys en el fetus⁶⁷.

Hipòtesi

La LLC és una malaltia hematològica causada principalment per l'increment de la resistència a l'apoptosi de les cèl·lules B leucèmiques, el que genera una expansió patològica d'aquestes cèl·lules alhora que en dificulta la total eliminació mitjançant tractaments que puguin permetre l'assoliment d'una remissió completa.

La curcumina és un compost natural d'origen vegetal, amb molt baixa toxicitat, que ha estat extensament estudiat en múltiples models de càncer i del qual se n'ha descrit el potencial per restablir els nivells d'apoptosi, potenciar l'efecte de múltiples fàrmacs i revertir la quimioresistència.

La citometria de flux, i més concretament, la citòmica funcional, permeten estudiar les cèl·lules de forma individualitzada i mantenint unes condicions que garanteixin la mínima pertorbació de les mostres i optimitzin el manteniment de la integritat i la fisiologia cel·lular.

Per aquest motiu, el projecte d'aquesta Tesi Doctoral es basa en la següent hipòtesi:

La curcumina té un efecte sinèrgic sobre diferents fàrmacs i afavoreix la quimiosensibilització i l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC per mitjà de diferents mecanismes, el que la faria un complement adequat pel tractament d'aquesta malaltia.

Objectius

L'objectiu i el propòsit principal d'aquesta Tesi Doctoral és avaluar el potencial de la curcumina com a possible adjuvant per tractar la LLC, mitjançant la mesura de l'efecte sinèrgic que produeix en combinació amb diferents fàrmacs i avaluant el seu efecte sobre diferents mecanismes implicats en l'apoptosi.

Els objectius secundaris són els següents:

1. Avaluar l'efecte sinèrgic de la curcumina en combinació amb diferents fàrmacs sobre cèl·lules de LLC.
 - 1.1. Mesurar l'efecte sinèrgic de la curcumina en combinació amb diferents fàrmacs proapoptòtics i antineoplàsics sobre models cel·lulars de LLC.
 - 1.2. Estudiar l'efecte sinèrgic de la curcumina en combinació amb diferents fàrmacs utilitzats en el tractament de la LLC sobre cultius primaris establerts a partir de mostres de sang perifèrica de pacients amb LLC.
 - 1.3. Estudiar l'efecte de la curcumina, sola i en combinació amb els diferents fàrmacs, sobre diversos paràmetres cel·lulars, com són el cicle cel·lular o la citomorfologia.
 - 1.4. Avaluar el potencial de la citòmica funcional per detectar poblacions amb característiques de cèl·lula mare de la LLC i estudiar l'efecte de la curcumina, sola i en combinació amb fàrmacs, sobre aquestes cèl·lules.
2. Avaluar l'efecte de la curcumina sobre diferents mecanismes implicats en la resistència a fàrmacs i l'apoptosi de les cèl·lules.
 - 2.1. Estudiar l'efecte de la curcumina sobre la producció cel·lular de ROS en models cel·lulars de LLC.
 - 2.2. Avaluar la capacitat d'extrusió de fàrmacs de diferents models cel·lulars de LLC i l'efecte de la curcumina sobre aquest mecanisme, com a possible via per la qual reverteix la quimioresistència.
 - 2.3. Estudiar l'efecte de la curcumina sobre els nivells d'activitat fosfatasa alcalina de les cèl·lules de la LLC.
 - 2.4. Avaluar l'efecte de la curcumina sobre l'activitat caspasa de les cèl·lules de LLC.

Material i mètodes

1. Línies cel·lulars

Per tal d'estudiar els efectes de la curcumina en combinació amb diferents fàrmacs proapoptòtics, es van utilitzar les línies cel·lulars derivades de LLC I83, Mec1 i EHEB. Totes tres van ser amablement proporcionades pel grup de la Dra. Marta Crespo, investigadora del Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO). A continuació s'exposen detalladament les característiques de tots tres models cel·lulars.

1.1. I83

La línia cel·lular I83-E95 (DSMZ ACC 763) es va establir l'any 1994 a partir de cèl·lules de sang perifèrica d'un home caucàsic de 75 anys amb LLC. Són autòlogues de la línia I83-LCL. Són positives pel virus Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*, EBV), amb infecció lítica i producció de virus actius¹⁸⁴.

Segons la fitxa descriptiva de la DSMZ, són cèl·lules de morfologia irregular, que creixen soles o en clústers, en suspensió. El cultiu es realitza amb medi RPMI amb un 20% de sèrum fetal boví (*Fetal Bovine Serum*, FBS). Tenen un temps de duplicació de 30-60 hores¹⁸⁴.

Les cèl·lules d'aquesta línia són CD19+, CD10-, CD20+, CD34- i CD38+. Tenen un cariotip hipotetraploide (83-88<4n>XXYY), i està descrit que tenen una deleció en el braç llarg del cromosoma 13 a causa de reordenaments cromosòmics¹⁸⁴.

1.2. Mec1

La línia Mec1 (DSMZ ACC 497) és una línia de LLC-B, establerta l'any 1993 a partir de sang perifèrica d'un home caucàsic de 61 anys, amb LLC-B en transformació prolimfocitoide cap a B-PLL. Aquesta línia cel·lular és positiva per EBV, amb infecció classificada com a latent sense producció de virus actius^{185,186}.

Les Mec1 són cèl·lules entre rodones i polimòrfiques, que creixen en suspensió, aïllades o formant petits agregats, i presenten certa adherència a les superfícies. Com a conseqüència d'aquestes característiques d'adhesivitat, ha estat necessari l'ús d'àcid etilendiaminotetraacètic (*Etilendiaminotetraacetic acid*, EDTA) 1 mM per tal de mantenir l'homogeneïtat dels passis durant els cultius cel·lulars. Com a medi de cultiu s'utilitza RPMI suplementat amb un 10% de FBS. El temps de duplicació és de 40 hores^{185,186}.

Les cèl·lules d'aquesta línia cel·lular són CD19+, CD5-, CD10-, CD20+, CD34- i CD38+. Tenen un cariotip quasidiploide amb un 10% de poliploidia^{185,186}. Està descrit que tenen moltes aberracions citogenètiques i que hi ha diferències fins i tot en comparar cèl·lules dins de la mateixa línia¹⁸⁷.

Les Mec1 sobreexpressen BCL-2, BAX i, de forma molt destacable, BCL-XL¹⁸⁷. A més, tenen una deleció en el cromosoma 17¹⁸⁷ i el gen *TP53* mutat^{188,189}, un indicador de mal pronòstic i de baixa resposta al tractament amb fludarabina, agents alquilants i altres anàlegs de purines^{1,4,5,24,26}. Aquestes característiques són d'especial rellevància per estudiar els mecanismes de resistència a fàrmacs i la disminució de l'apoptosi.

La línia cel·lular Mec2 (DSMZ ACC 500) es va establir a partir de sang perifèrica del mateix pacient un any més tard, quan les característiques de B-PLL eren evidents¹⁹⁰.

1.3. EHEB

La línia EHEB (DSMZ ACC 67) es va establir l'any 1988 a partir de cèl·lules de sang perifèrica d'una dona de 69 anys amb LLC-B. Aquest model representa més aviat una línia limfoblastoide B immortalitzada per EBV, amb signes poc evidents de transformació maligna, en comparació a les línies de LLC-B en sentit estricte¹⁸⁶. Aquesta línia cel·lular és positiva per EBV, amb infecció classificada com a latent, sense producció de virus actius^{186,191}.

Les cèl·lules d'aquesta línia presenten una morfologia limfoblastoide, amb formes arrodonides i poligonals, i creixen en suspensió, aïllades o formant agregats. Es recomana cultivar amb RPMI suplementat amb un 10% de FBS. El seu creixement és lent, amb un temps de duplicació d'entre 50 i 70 hores¹⁹¹. Les EHEB utilitzades en la present Tesi Doctoral han estat cultivades amb un 20% de FBS, a causa de les limitacions de proliferació que presentaven.

Les cèl·lules d'aquesta línia són CD19+, CD10-, CD20+, CD34- i CD38+. Tenen un cariotip hipodiploid, amb un 1,6% de poliploidia¹⁹¹.

2. Cultius primaris

Per a l'estudi dels efectes de la curcumina i els fàrmacs sobre cultius primaris, es van analitzar mostres de sang perifèrica anticoagulada amb EDTA, de donants sans i de pacients amb LLC obtingudes del servei d'Hematologia de l'ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona). Les mostres de LLC havien estat prèviament estudiades per citometria de flux per al diagnòstic clínic en un citòmetre Navios (Beckman Coulter), utilitzant anticossos monoclonals dirigits a diferents marcadors de LLC.

En total es van obtenir i analitzar mostres de sang perifèrica ($n = 52$) de 46 pacients amb LLC en diferents estadis de la malaltia. Es van realitzar cultius primaris a partir d'un subgrup de mostres ($n = 29$), provinents de 25 pacients diferents (17 homes i 8 dones; edat mitjana de 72 anys, rang 53-88). També es van analitzar i es van establir cultius primaris a partir de sang perifèrica de controls negatius ($n = 4$), consistents en mostres de pacients sense cap malaltia hematològica coneguda.

Tots els pacients van proporcionar el seu consentiment informat d'acord amb la Declaració de Hèlsinki. Tots els procediments es van realitzar d'acord amb els protocols interns del laboratori autoritzats pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona).

3. Fàrmacs i curcumina

Per preparar les diferents concentracions dels fàrmacs i la curcumina es va utilitzar DMSO com a diluent, a excepció del rituximab, pel qual es va utilitzar HBA.

La curcumina va ser obtinguda de Naturex (puresa 95%), i es va preparar a solucions d'estoc 1-10 mM. Els fàrmacs etopòsid, camptotecina i colquicina es van obtenir de Sigma Aldrich i es van preparar per obtenir unes solucions d'estoc de 0,1 mM, 0,005 mM i 0,005 mM respectivament. La citarabina es va obtenir d'Accord i es va preparar a una solució d'estoc de 0,01 mM i la fludarabina es va obtenir d'Aurovitas i es va preparar a solucions d'estoc 1-10 mM.

Pel que fa al rituximab (MabThera[®], Roche), és un preparat en solució salina per a perfusió intravenosa. Es va utilitzar a la concentració original del preparat, 10 mg/mL.

L'ibrutinib (Imbruvica, Janssen) es presenta en càpsules de 140 mg. El contingut d'una càpsula es va dissoldre en DMSO per tal d'obtenir concentracions d'estoc 5-10 mM. El venetoclax (Venclyxto, AbbVie) es presenta en comprimits de 100 mg. El comprimit es va dissoldre en DMSO per tal d'obtenir concentracions d'estoc 0,1-7,4 mM.

4. Reactius i materials

Agents fluorescents:

Diamino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich®, cat. no. D9542)

Hoechst 33342 (Ho342) (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. H1399)

Propidium iodide (PI) ≥ 94.0% (Sigma-Aldrich®, cat. no. P4170)

Alkaline Phosphatase Live Stain (APLS) (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. A14353)

CellROX™ Deep Red Reagent (Thermo Fisher Scientific, cat. no. C10422)

Mitoxantrona (MTX) (Sigma-Aldrich®)

Doxorubicina (Doxo) (Sigma-Aldrich®)

Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich®)

I1 (Inhibidor experimental)

Generic Caspase Activity Assay Kit (Fluorometric Red) (Abcam, cat. no. AB112131)

Altres reactius:

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich®, cat. no. 20-139)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich® cat. no. P8139)

Etilendiaminotetraacetic acid (EDTA) (Calbiochem® cat. no. 324503)

Eosina-blau de metilè en solució segons May-Grünwald modificada (Merck, cat. no. 101424)

Atzur-eosina-blau de metilè segons Giemsa en solució (Merck, cat. no. 109204)

Anticossos monoclonals conjugats a fluorocrom:

Anti-Human CD19-AF700, clon LT19 (Sysmex, cat .no. CR683487)

Anti-Human CD19-APC, clon LT19 (Sysmex, cat. no. AM998972)

Anti-Human CD19-PE, clon LT19 (Sysmex, cat. no. AF021857)

Anti-Human CD19-PE-Cy7, clon LT19 (Sysmex, cat. no. CC335596)

Anti-Human CD5-APC, clon L17F12 (Sysmex, cat. no. BU171249)

Anti-Human CD5-PE, clon UCHT2 (BD, cat. no. 555353)

Anti-Human CD5-PacB, clon L17F12 (Sysmex, cat. no. CA236265)

Anti-Human CD38-PE, clon HIT2 (Sysmex, cat. no. CF116963)

Medis de cultiu, tampons, solució lisant d'eritròcits i fixació amb etanol:

RPMI 1640 w/L-Glu (Biowest, cat. no. L0500-500), suplementat amb:

- 10% o 20% sèrum fetal boví; Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, cat. no. S181B-500)
- 2 mM L-glutamina; L-Glutamine 100x (Biowest, cat. no. X0550-100)
- 1 mM sodi piruvat; Sodium Pyruvate (Biowest, cat. no. L0642-100)
- 15 U/L penicil·lina i 15 ng/L estreptomycina, Penicillin-Streptomycin 100x (Biowest, cat. no. L0022-100)

Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat. no. HBSS-2A)

Hanks' Balanced Salt Solution amb Albúmina i Azida Sòdica (HBA):

- Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat. no. HBSS-2A)
- 1% Albúmina de sèrum boví; Albumin, from bovine serum (Sigma-Aldrich®, cat. no. A7906)
- 0,1% NaN₃; Sodium azide extra pure (Sigma-Aldrich®, cat. no. 71290)

Solució de lisi d'eritròcits amb clorur d'amoni 10x:

- Aigua destil·lada (H₂O_d)
- 1,5 M NH₄Cl; Ammonium Chloride (Sigma-Aldrich® cat. no. A9434)
- 100 mM NaHCO₃; Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich® cat. no. S5761)
- 1 mM C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈; EDTA, disodium salt (Calbiochem cat. no. 324503)

Preparada a pH = 7,4 (ajustat amb 1 N HCl i 1 N NaOH)

Solució de lisi de clorur d'amoni 1x:

- H₂O_d (90%)
- Solució de lisi de clorur d'amoni 10x (10%)

Solució d'etanol al 70%:

- 72,6% EtOH; Alcohol neutre d'origen agrícola 96,3° (Alcoholes Gual S.A., cat. no. 64-17-5)
- 27,4% H₂O_d

Fluids i microesferes de citometria de flux:

Attune™ Focusing Fluid (1x) (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24904)

Attune™ Performance Tracking Beads (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 4449754)

Attune™ Shutdown Solution (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24975)

Attune™ Wash Solution (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24974)

5. Equipaments

5.1. Citometria de flux

Citòmetre de flux amb enfocament acústic Attune™ NxT: Invitrogen™ Attune™ NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24858)

5.1.1. Configuració dels filtres del sistema òptic

En general, els citòmetres disposen dels següents tipus de filtres:

- Filtres de pas de banda (*bandpass*, BP), transmeten longituds d'ona dins d'un rang concret, i exclouen les que estan fora del rang
- Filtres de pas llarg (*longpass*, LP), atenuen les longituds d'ona més curtes i transmeten les superiors al rang establert
- Filtres de pas curt (*shortpass*, SP), atenuen les longituds d'ona més llargues i transmeten les inferiors al rang establert
- Filtres dicroics de LP (*dichroic* LP, DLP), transmeten la llum dins d'un petit rang de longituds d'ona i reflecteixen la resta

A continuació s'especifiquen les combinacions de filtres utilitzades:

Configuració bàsica

SSC: làser blau (488 nm), filtre 488/10 BP

FSC: làser blau (488 nm), filtre 488/10 BP

Anàlisi de la integritat de la membrana cel·lular:

PI: làser groc-verd (561 nm), filtres 650 DLP i 620/15 BP en el detector YL2

Anàlisi del cicle cel·lular:

DAPI: làser violeta (405 nm), filtres 495 DLP i 440/50 BP en el detector VL1

Anàlisi de ROS:

CellROX: làser vermell (640 nm), filtres 690 DLP i 670/14 BP en el detector RL1

Anàlisi de l'activitat fosfatasa alcalina amb APLS:

APLS: làser blau (488 nm), filtres 555 DLP i 530/30 BP en el detector BL1

Anàlisi de l'extrusió de fàrmacs:

Ho342: làser violeta (405 nm), filtres 495 DLP i 440/50 BP en el detector VL1

Doxo: làser blau (488 nm), filtres 650 DLP i 590/40 en el detector BL2

MTX: làser vermell (640 nm), filtres 690 DLP i 670/14 BP en el detector RL1

Rho123: làser blau (488 nm), filtres 555 DLP i 530/30 BP en el detector BL1

Immunofenotipatge:

CD19-APC: làser vermell (640 nm), filtres 690 DLP i 670/14 BP en el detector RL1

CD5-Pacific Blue: làser violeta (405 nm), filtres 495 DLP i 440/50 BP en el detector VL1

CD38-PE: làser groc-verd (561 nm), filtres 139 DLP i 585/16 BP en el detector YL1

Configuració per analitzar SSC amb làser violeta

SSC: làser blau (488 nm), filtre 488/10 BP

FSC: làser blau (488 nm), filtre 488/10 BP

SSC violeta: làser violeta (405 nm), filtre 405/10 BP en el detector VL1

Anàlisi de les caspases:

Ho342: làser violeta (405 nm), filtres 495 DLP i 440/50 BP en el detector VL2

VAD-Caspases: làser vermell (640 nm), filtres 690 DLP i 670/14 BP en el detector RL1

PI: làser groc (561 nm), filtres 650 DLP i 620/15 BP en el detector YL2

Anàlisi mostres de sang de pacients amb LLC:

Ho342: làser violeta (405 nm), filtres 495 DLP i 440/50 BP en el detector VL2

APLS: làser blau (488 nm), filtres 555 DLP i 530/30 BP en el detector BL1

PI: làser groc-verd (561 nm), filtres 650 DLP i 620/15 BP en el detector YL2

Combinacions de diferents conjugats de CD19 i CD5:

CD19/CD5-PE: làser groc-verd (561 nm), filtres 139 DLP i 585/16 BP en el detector YL1

CD19/CD5-APC: làser vermell (640nm), filtres 690 DLP i 670/14 BP en el detector RL1

CD19-Alexa Fluor 700: làser vermell (640 nm), filtres 740 DLP i 720/30 en el detector RL2

CD19 PE-Cy7: làser groc-verd (561 nm), filtres 740 DLP i 780/60 BP en el detector YL4

5.2. Microscòpia òptica

Microscopi òptic Olympus BX53

Càmera digital d'alta definició Olympus digital càmera (Olymus corporation) DP21

5.3. Cultius cel-lulars

Cabina de flux: NuAire LabGard ES (Energy Saver) NU-437 Class II Biological Safety Cabinet (Nuairé™, NU-437-400E).

Incubador: Water-Jaketed US Autoflow Automatic CO₂ incubator Model NU-4750E (Nuairé™, discontinuat).

6. Cultius cel·lulars i incubació amb fàrmacs

Les cèl·lules derivades de LLC, ja fossin línies cel·lulars o cultius primaris derivats de mostres de sang de pacients amb LLC, es van mantenir amb RPMI suplementat amb un 10% de FBS, 2% de glutamina, 1% de sodi-piruvat i 1% de penicil·lina-estreptomicina, en incubador cel·lular a 37 °C i una concentració de CO₂ del 5%. Per les cèl·lules de la línia EHEB es va utilitzar un 20% de FBS, atès que presentaven un creixement més lent.

Per a les anàlisis d'integritat de la membrana cel·lular, proliferació, cycle cel·lular i citomorfologia realitzades sobre les línies I83, Mec1 i EHEB, les cèl·lules es van sembrar en aquestes mateixes condicions en plaques multipouet. Es van utilitzar plaques de 24 pouets, amb un volum final de 2 mL per pouet i una concentració cel·lular de sembra de 100.000 cèl·lules per pouet (50.000 cèl·lules/mL).

Als pouets se'ls van afegir combinacions de la curcumina amb els diferents fàrmacs i es van analitzar a diferents temps d'incubació (0, 24, 48 i 72 hores). Les concentracions òptimes de treball es van determinar per la curcumina i per cada fàrmac. Les concentracions finals (CF) van ser les següents: 5 µM per la curcumina; 0,1 µM per l'etopòsid; 0,005 µM per la camptotecina; 0,005 µM per la colquicina; 0,01 µM per la citarabina i 10 µM per la fludarabina. El volum de curcumina o fàrmac afegit a cada pouet va ser de 2 µL (en un volum de 2 mL), de manera que es va utilitzar una concentració d'estoc 1000x de la concentració final requerida. Les incubacions es van realitzar per triplicat (**Figura 16 A**).

Els cultius primaris derivats de mostres de sang de pacients amb LLC (n = 29) es van realitzar directament en plaques de 24 pouets. Els eritròcits es van lisar prèviament amb la solució lisant de clorur d'amoni, diluint la mostra amb la solució de lisi 1x en una proporció 1:10 (utilitzant 3 mL de clorur d'amoni 1x i 300 µL de mostra). Després de 10 minuts d'incubació a temperatura ambient, es va fer un rentat, centrifugant 5 minuts a 1500 rpm i eliminant el sobrenedant. El botó cel·lular es va resuspendre en 300 µL de RPMI amb un 10% de FBS i es va sembrar en 6 pouets, afegint 50 µL de la suspensió cel·lular en un volum de RPMI de 2 mL per cada pouet. Les concentracions leucocitàries de sembra van ser d'entre 40 i 4000 leucòcits/µL.

El tractament amb fàrmacs dels cultius primaris es va fer d'acord amb el tractament que havia rebut cada pacient, i per tant, de forma individualitzada i personalitzada. En el cas dels pacients que havien rebut tractament amb FCR, la mostra es va tractar amb tots dos fàrmacs, fludarabina i rituximab, per separat. Es va utilitzar un pouet pel control (DMSO), un per la curcumina 5 µM, un pel fàrmac que s'estigués estudiant, i un darrer amb el fàrmac combinat amb curcumina 5 µM (**Figura 16 B**). El volum de fàrmac, curcumina o DMSO afegits va ser sempre de 2 µL. Les concentracions finals van ser curcumina 5 µM, fludarabina 10 µM (i 1 µM en algun cas), ibrutinib 10 µM, rituximab 10 µg/mL, i venetoclax 100 nM. En alguns casos, les anàlisis realitzades a un sol pacient van ser superiors a quatre, ja que es va estudiar més d'un fàrmac, diverses

concentracions del mateix fàrmac o es va analitzar la mostra a diferents temps d'incubació.

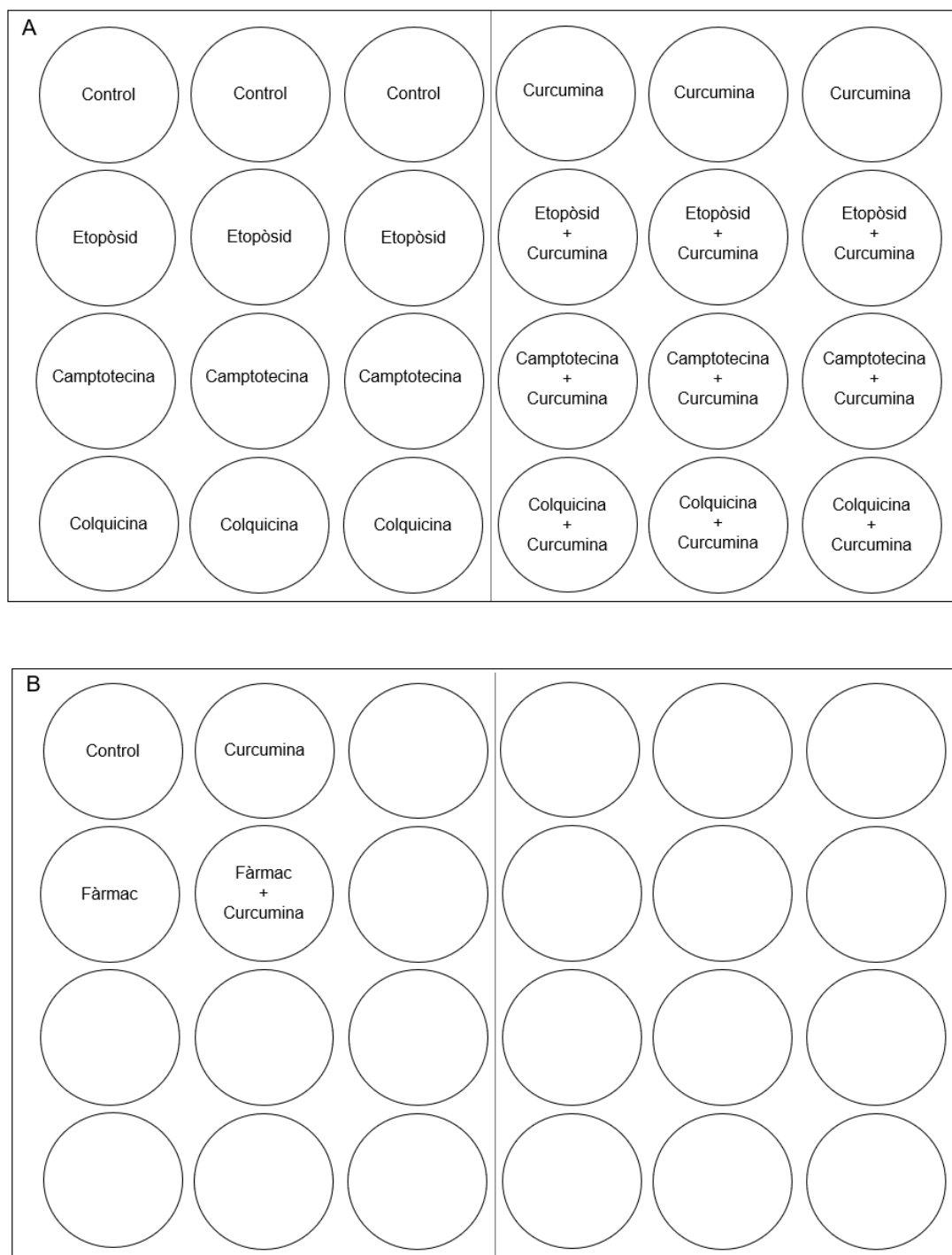


Figura 16: Esquema de la distribució dels experiments de sinergisme en una placa de 24 pouets. A Línies cel·lulars. En les anàlisis realitzades amb les línies cel·lulars, cada fàrmac i la seva combinació amb la curcumina es va estudiar per triplicat, de manera que va caldre aproximadament una placa i mitja per analitzar els 5 fàrmacs en estudi, a un sol temps d'incubació i per una única línia cel·lular. Els experiments es van realitzar per les tres línies cel·lulars, i a 24, 48 i 72 hores d'incubació. **B Cultius primaris.** Els experiments amb cultius primaris derivats de cèl·lules de pacients amb LLC van ocupar 4 pouets en general, corresponents al control negatiu, la curcumina, el fàrmac testat i el mateix fàrmac en combinació amb la curcumina. En alguns experiments es va testar més d'un fàrmac o diferents concentracions d'un mateix fàrmac.

7. Anàlisi de la integritat de la membrana cel·lular i de la proliferació

Per tal d'estudiar l'efecte dels diferents tractaments amb la curcumina i els fàrmacs, es va analitzar el seu impacte sobre la integritat de la membrana cel·lular i la proliferació cel·lular. Passat el temps d'incubació es va agafar 1 mL de mostra de cada pouet (concentració cel·lular entre 50 i 800 cèl·lules/ μ L) i es va incubar 5 minuts en fosc amb 2 μ L de PI 100 μ g/mL, i posteriorment es va analitzar per citometria de flux, diferenciant entre les cèl·lules positives i negatives per PI.

A partir dels resultats de toxicitat obtinguts, es va calcular el coeficient d'interacció de fàrmacs (*Coefficient of Drug Interaction*, CDI) per tal de determinar l'efecte sinèrgic de la curcumina amb els diferents fàrmacs.

$$CDI = \frac{\text{Supervivència (Fàrmac + Curcumina)}}{\text{Supervivència (Fàrmac)} \times \text{Supervivència (Curcumina)}} \times 100$$

Un CDI > 1 indica que l'efecte és antagonista, un CDI = 1 indica que és additiu, i un CDI < 1 indica que és sinèrgic.

A partir dels resultats obtinguts de la concentració cel·lular, es va calcular la proliferació cel·lular, tenint com a referència que al t_0 la concentració era de 5×10^4 cèl·lules/mL.

8. Anàlisi del cicle cel·lular

Per analitzar els efectes sobre el cicle cel·lular, les cèl·lules tractades es van recollir al temps d'incubació corresponent i es van fixar i permeabilitzar, centrifugant-ne 1 mL (concentració mínima de 5×10^4 cèl·lules/mL), resuspenent el botó cel·lular en 1 mL d'etanol al 70% i mantenint-les a -20 °C un mínim de 24 hores. Passat aquest procés, les cèl·lules es van centrifugar per rentar l'etanol, es van resuspendre en 1 mL d'HBSS, se'ls van afegir 2 μ L de DAPI 1 mg/mL i es van incubar en fosc durant 30 minuts a temperatura ambient abans d'analitzar-les al citòmetre.

En funció de la intensitat de fluorescència del DAPI, es van obtenir els percentatges de cèl·lules en cada fase del cicle (G0G1, S i G2M). Per tal de poder analitzar i representar les dades obtingudes (3 fases del cicle; per control, curcumina, fàrmac i la combinació dels dos; per tres línies; a tres temps d'incubació), es va calcular la ràtio $(S + G2M) / G0G1$, que permet detectar la proporció de cèl·lules en proliferació. El possible efecte dels fàrmacs també es va analitzar a cada fase del cicle cel·lular per separat.

9. Anàlisi de la citomorfologia

Per avaluar els efectes de la curcumina i els fàrmacs per microscòpia òptica, les cèl·lules recollides a les 0, 24, 48 i 72 hores d'incubació van ser sotmeses a citocentrifugacions de 10 minuts a 250 rpm (7 g) sobre portaobjectes i es van fixar i tenyir per May-Grünwald (5 minuts) i Giemsa en solució 1:5 en aigua (15 minuts). Les preparacions es van analitzar visualment per microscòpia òptica (4-100X) per detectar canvis en la citomorfologia induïts pels diferents tractaments.

10. Immunofenotipatge

Per a la caracterització de les diferents línies cel·lulars, es van fer marcatges amb anticossos monoclonals conjugats a fluorocroms dirigits als marcadors que es volien determinar. Els anticossos utilitzats van ser CD19-APC, CD5-PacB i CD38-PE (Sysmex).

En tots els casos es va fer un recompte cel·lular i es va agafar el volum necessari per tenir 1×10^6 cèl·lules. Aquestes es van centrifugar i resuspendre en 100 μL d'HBA, que conté albúmina, indispensable per bloquejar possibles unions inespecífiques dels anticossos dels marcadors.

A continuació es va afegir la quantitat requerida d'anticòs monoclonal seguint les indicacions del fabricant i es van incubar en foscor i a temperatura ambient durant 20 minuts. Passat aquest temps, es van afegir 1000 μL d'HBA i es van analitzar al citòmetre de flux.

11. Anàlisi de la producció de ROS en línies cel·lulars

L'efecte de la curcumina sobre la producció de ROS es va avaluar en les línies cel·lulars I83, Mec1 i EHEB. A continuació s'explica detalladament la posada a punt de la tècnica.

En primer lloc, en tots els casos cal estimular les cèl·lules per tal de tenir un control positiu de la producció de ROS. Per aquesta estimulació, es van assajar dos reactius diferents, el primer, el *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA), un èster de forbol. El PMA actua com a estimulador cel·lular en general, i en el cas estudiat, com a inductor de la producció endògena de ROS, principalment del radical superòxid. El segon agent utilitzat pel control positiu va ser el tert-butil hidroperòxid (TBHP), un agent inductor d'estrès oxidatiu d'acció directa¹⁹².

Pel que fa a la detecció de ROS, es van utilitzar dos compostos diferents. El primer, la dihidrorodamina 123 (DHR), que és un substrat no fluorescent que es transforma en presència de ROS, produint rodamina 123 que quan s'excita amb el làser blau emet fluorescència a 530 nm. En segon lloc, es va fer servir el kit CellROX™, de Thermo Fisher. Es va escollir el kit Deep Red, amb un màxim d'absorció en 644 nm (làser vermell) i emissió en 665 nm, ja que és el que més s'allunya de l'espectre d'absorció de la curcumina i tampoc presenta solapament amb el PI quan s'excita amb el làser groc-verd.

Per a la detecció de ROS amb DHR, per cada experiment es va realitzar l'estimulació de 5×10^5 cèl·lules en un volum final d'1 mL amb 4 μ L de TBHP (CF = 200 μ M), PMA (CF = 1 μ g/mL), DMSO o curcumina (CF = 1-10 μ M) segons correspongués, i es va incubar 30 minuts a 37 °C. Passat aquest temps, es va afegir la DHR (CF = 0,3 μ M) i es va incubar 20 minuts més a 37 °C. Finalment, es van afegir 2 μ L de DAPI 1 mg/mL i es va analitzar al citòmetre de flux.

Pel que fa a la detecció de ROS amb CellROX, per cada experiment es van sembrar 5×10^5 cèl·lules en placa, en un volum final d'1 mL (utilitzant RPMI amb un 10% de FBS), es van afegir 4 μ L de TBHP (CF = 200 μ M), PMA (CF = 1 μ g/mL), DMSO o curcumina (CF = 1-10 μ M) segons correspongués i es va incubar durant diferents temps en incubador (30 minuts i 24, 48 i 72 hores d'incubació). Passat el temps d'incubació, es va afegir el reactiu CellROX Deep Red (CF = 5 μ M) i es va incubar 30 minuts en incubador de CO₂. Finalment es va marcar amb 2 μ L de PI 100 μ g/mL durant 5 minuts i es va analitzar al citòmetre de flux.

12. Anàlisi de l'extrusió de fàrmacs

Per tal de determinar si les diferents línies cel·lulars de LLC estudiades tenien capacitat d'excloure activament fàrmacs, es va realitzar una anàlisi d'extrusió utilitzant diferents substrats i inhibidors dels transportadors multidroga. El fonament d'aquesta anàlisi consisteix en avaluar la reducció de la concentració dels diferents substrats a l'interior cel·lular a través de la disminució de la fluorescència, indicativa de la seva extrusió a l'exterior de la cèl·lula.

La característica indispensable del substrat per a aquest tipus d'anàlisi és que emeti fluorescència, i per tant, que sigui detectable per citometria. Pel que fa a l'inhibidor, és un compost que interactua amb els transportadors de fàrmacs i redueix la seva activitat. D'aquesta manera, l'increment en la intensitat de la fluorescència de les cèl·lules després d'afegir l'inhibidor, indica la capacitat de reversió del transportador multidroga.

El procediment de les anàlisis va ser el següent. Es va treballar amb placa multipouet. Per cada combinació d'un substrat amb un inhibidor, es van sembrar tres pouets, corresponents a l'inhibidor sol (control negatiu), substrat sol, i substrat més inhibidor. A cada pouet s'hi van sembrar 1×10^5 cèl·lules en 1 mL de RPMI amb un 10% de FBS. A continuació, es van afegir 5 μ L de substrat i/o inhibidor segons el que correspongués a cada pouet i es va incubar 1 h en incubador (37 °C, 5% de CO₂). Passada la incubació, es va realitzar un rentat de les cèl·lules incubades amb substrat i amb substrat més inhibidor, i es van resuspendre altra vegada amb 1 mL de RPMI amb un 10% de FBS. A les cèl·lules que havien estat amb substrat més inhibidor, se'ls van tornar a afegir 5 μ L d'inhibidor. La placa es va incubar 1 hora més a l'incubador, i passat aquest temps, es van afegir 2 μ L de DAPI (o PI, si el substrat es mesurava amb el làser violeta, com és el cas del Ho342) per tal de descartar cèl·lules necròtiques i es va analitzar al citòmetre.

En primer lloc, es va analitzar si les cèl·lules tenien capacitat d'extrusió de diversos fàrmacs. Com a inhibidor es va fer servir un compost experimental protegit sota patent, anomenat a partir d'ara com a I1 (CF = 50 nM). Com a substrats, es van utilitzar la mitoxantrona (MTX) (CF = 200 nM), la doxorubicina (Doxo) (CF = 2 μ M), la rodamina 123 (Rho123) (CF = 100 ng/mL) i el Hoechst 33342 (Ho342) (CF = 5 μ g/mL). Posteriorment, es va repetir el mateix assaig utilitzant la curcumina (CF = 5 μ M) com a inhibidor de l'extrusió. Les proves es van fer utilitzant MTX com a substrat, ja que és el que dona menys problemes de solapament dels espectres d'emissió de fluorescència amb la curcumina.

Finalment, utilitzant sempre MTX com a substrat, es van testar com a inhibidors els fàrmacs antileucèmics fludarabina (CF = 10 μ M), citarabina (CF = 0,01 μ M), ibrutinib (CF = 10 μ M) i venetoclax (CF = 10 nM), per tal de detectar si interactuaven amb els transportadors de fàrmacs. Finalment, es van combinar també amb la curcumina (fàrmac més curcumina com a inhibidor) per determinar si aquesta produïa algun efecte en ser combinada.

13. Anàlisi de l'activitat fosfatasa alcalina en línies cel·lulars

L'activitat fosfatasa alcalina de les línies cel·lulars es va mesurar utilitzant el reactiu *Alkaline Phosphatase Live Stain* (APLS) de Thermo Fisher, específic per a la detecció de cèl·lules mare pluripotents. Quan aquest marcador s'excita amb el làser blau (488 nm), la seva fluorescència es pot recollir amb el mateix canal que s'utilitza per l'isotiocianat de fluoresceïna (530/30). Tot i que el producte està dirigit a anàlisi d'imatge per fluorescència, el nostre grup ha adaptat el protocol per utilitzar-lo en anàlisi per citometria de flux^{56,57}.

A fi d'estudiar els efectes que produïa la curcumina sobre l'activitat fosfatasa alcalina, es va realitzar un primer marcatge amb APLS amb les diferents línies cel·lulars estudiades, i es va detectar que presentaven activitat. A partir d'aquí, es va determinar si la curcumina a diferents concentracions tenia algun efecte sobre l'activitat d'aquest enzim.

Per realitzar el marcatge APLS en línies cel·lulars, es van plaquejar les cèl·lules a una concentració de 1×10^5 cèl·lules per pouet, en un volum final de 2 mL, i es van tractar amb diferents concentracions de curcumina (CF = 0, 1, 5 i 10 μM). Passat el temps d'incubació (24, 48 i 72 hores), de cada pouet se'n van agafar dues alíquotes d'1 mL, es va fer un rentat i les cèl·lules es van resuspendre en 100 μL d'HBSS. Per cada tractament, es va afegir 1 μL d'APLS (concentració d'estoc 500X) a una de les dues alíquotes i es va deixar l'altra com a blanc (1 μL de DMSO), i es van incubar al bany a 37 °C durant 20 minuts. Finalment, es van afegir 2 μL de DAPI 1 mg/mL per descartar les cèl·lules necròtiques i es va analitzar al citòmetre de flux.

14. Anàlisi de caspases

Per tal de determinar l'efecte de la curcumina sola o en combinació amb fàrmacs sobre les caspases, es van realitzar diverses proves amb una sonda profluorogènica de detecció de caspases (Abcam). Es tracta d'una sonda no fluorescent que conté una seqüència de pèptids (Val-Ala-Asp, VAD) reconeguda per la majoria de caspases activades. El trencament d'aquest enllaç peptídic en presència de caspases actives fa que la molècula profluorogènica esdevingui fluorescent. Aquesta prova permet detectar l'activitat de les caspases de forma genèrica (detecció de caspases 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9). El seu màxim d'excitació es troba al voltant de 647 nm i la seva emissió al voltant de 660 nm, de manera que no genera cap solapament de l'espectre d'emissió de fluorescència amb la curcumina.

A continuació es descriu el procediment utilitzat per estudiar l'activitat caspasa en cultius primaris. Després de realitzar el tractament que correspongués, es va agafar 1 mL de cèl·lules, es van centrifugar i es van resuspendre en 0,5 mL del mateix sobrenedant, per tal d'assolir la concentració cel·lular òptima per realitzar el marcatge, entre 5×10^5 i 1×10^6 cèl·lules/mL. Posteriorment es va afegir 1 μ L de la sonda TF5-VAD-FMK i es va incubar al bany humit a 37 °C, establint un temps d'incubació idoni de 2 hores. Transcorregut aquest temps, es van fer dos rentats amb HBSS, es van resuspendre les cèl·lules en 50 μ L d'HBSS i es va realitzar un marcatge amb 5 μ L de Ho342 1 mg/mL durant 30 minuts a 37 °C per seleccionar les cèl·lules nucleades. Posteriorment, es va realitzar un marcatge amb 1 μ L de PI 100 μ g/mL durant 5 minuts per excloure les cèl·lules necròtiques i es va analitzar al citòmetre de flux.

A la **Figura 17** es mostra la plantilla d'adquisició bàsica utilitzada per a l'anàlisi de les caspases en cultius primaris.

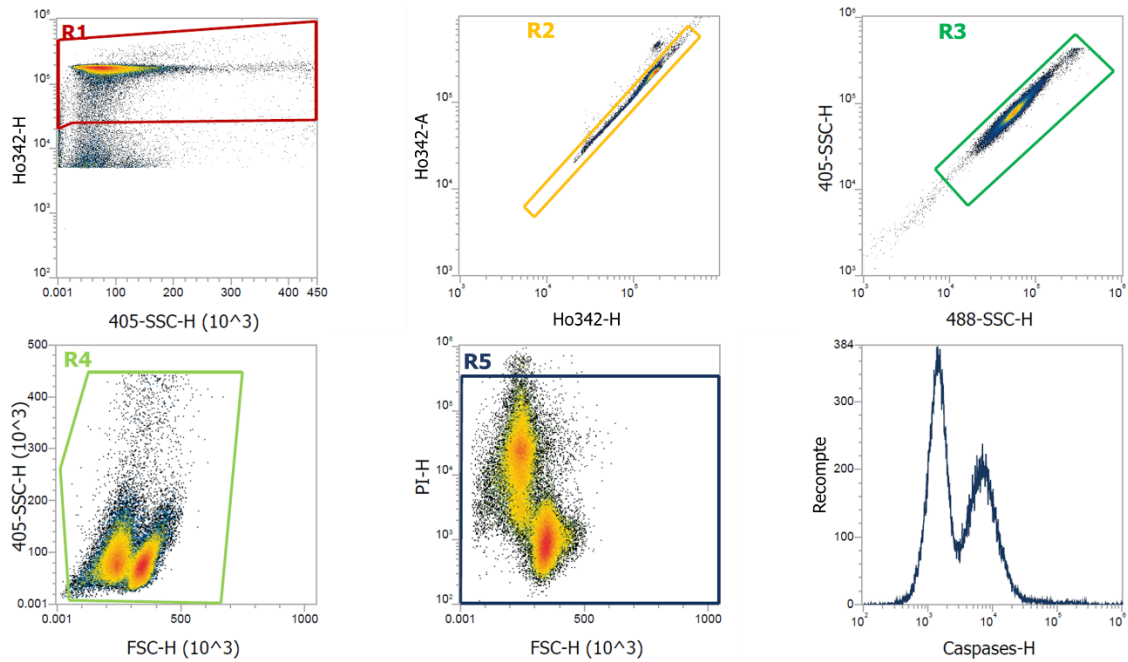


Figura 17: Plantilla d'adquisició dissenyada per a l'anàlisi de les caspases en cultius primaris. En R1 es discriminen les cèl·lules nucleades de restes cel·lulars, utilitzant el Ho342 per detectar el contingut de DNA. En R2 s'exclouen agregats. La selecció R3 és útil per descartar events coincidents. En R4 s'acaben de descartar possibles restes cel·lulars presents en la mostra. En R5 se seleccionen les cèl·lules en funció de la seva integritat de membrana cel·lular, permetent seleccionar-les totes o excloure aquelles amb un major grau d'afectació. En el cas de la figura, s'han inclòs les cèl·lules necròtiques i prenecròtiques, a fi de visualitzar la diferent intensitat de l'activitat caspasa. Finalment, s'avalua la distribució de les cèl·lules en funció de l'activitat caspasa. La plantilla permet realitzar anàlisis complementàries que no es mostren en aquesta figura, com poden ser els nivells d'activació de les caspases en les cèl·lules leucèmiques (CD19+ CD5+) o en aquelles que presenten una major activitat ALP.

15. Anàlisi de la combinació de la curcumina i fàrmacs sobre els cultius primaris

Per l'anàlisi de les mostres de sang de pacients amb LLC, es van combinar quatre marcadors fluorescents: Ho342, per distingir les cèl·lules nucleades dels eritròcits i del soroll de fons¹⁹³; PI, per descartar les cèl·lules necròtiques; anticossos monoclonals conjugats a fluorocroms dirigits a CD19 i CD5, específics de les cèl·lules de la LLC; i APLS, per detectar, en funció de l'activitat fosfatasa alcalina, cèl·lules més primitives i potencials cèl·lules mare leucèmiques entre les cèl·lules de la LLC.

Aquests marcatges es van realitzar adaptant el protocol prèviament descrit pel nostre grup (*Rico et al. 2016*). Breument, es posa en un tub eppendorf el volum de sang necessari per tenir 1×10^6 cèl·lules. Aquest volum no ha de superar els 100 μL , i en cas que la concentració no permeti arribar al milió de cèl·lules, s'utilitzen 100 μL . En cas que el volum de sang requerit sigui menor, s'acaben d'assolir els 100 μL de volum afegint HBSS. Posteriorment, s'afegeixen 10 μL de FBS (com a bloquejant) i 10 μL de Ho342 1 mg/mL i s'incuba 10 minuts al bany humit, a 37 °C, protegit de la foscor. Passat aquest temps, s'afegeix 1 μL d'APLS (concentració d'estoc 500X) i s'incuba 20 minuts més a 37 °C, també en bany humit i protegit de la foscor.

Posteriorment, s'afegeixen els anticossos per CD5 i CD19 (5 o 10 μL segons indiqui el fabricant) i s'incuba 20 minuts a temperatura ambient. Per qüestions de disponibilitat, s'han utilitzat anticossos conjugats a diferents fluorocroms, sempre tenint en compte que amb els fluorocroms utilitzats no se solapessin fluorescències i després de comprovar que no hi havia diferències en els resultats. Així, s'han utilitzat els següents anticossos monoclonals: CD5-PE, CD5-APC, CD19-APC, CD19-AF700 i CD19 PE-Cy7.

Finalment, es passa la mostra a un tub de citometria (4,5 mL), s'afegeix HBSS fins a 3 mL, 2 μL de PI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, s'incuba 5 minuts a temperatura ambient i s'analitza al citòmetre de flux.

Per analitzar les cèl·lules dels cultius primaris, passat el temps d'incubació (es van testar diversos temps, compresos entre 2 i 6 dies), es va agafar 1 mL de cadascun dels pouets, es va centrifugar i el botó cel·lular es va resuspendre en 50 μL d'HBSS. A partir d'aquí, es va realitzar el mateix marcatge CD5 CD19 APLS descrit, mantenint les concentracions.

16. Anàlisi de les dades

Els resultats obtinguts es van analitzar amb el programari d'anàlisi Attune™ NxT Software versió 2.6 (Applied Biosystems™), Excel (Microsoft) i GraphPad Prism8 (GraphPad Software, Inc.). Per l'anàlisi de les fases del cicle cel·lular també es va utilitzar el programa informàtic FCS Express 5 FlowResearch Edition (De Novo Software™).

Dels triplicats dels experiments, se'n va obtenir la mitjana i la desviació estàndard. El nivell de significació es va calcular utilitzant una prova t de Student de dues cues. Pel que fa als cultius primaris, també es va utilitzar una prova t de Student, utilitzant un test no paramètric (Wilcoxon test). Els resultats amb un p-valor inferior a 0,05 van ser considerats com a significatius. En tots els casos, els valors obtinguts amb els fàrmacs o la curcumina es van comparar amb els del control per determinar si hi havia diferències significatives. Els valors de la combinació de fàrmac i curcumina es van comparar amb els que s'obtenien del fàrmac sense curcumina.

En les anàlisis de producció de ROS, extrusió de fàrmacs i activitat fosfatasa alcalina, les Mitjanes d'Intensitat de Fluorescència (MIF) dels diferents marcadors fluorescents es van utilitzar per calcular la Intensitat Relativa de Fluorescència (IRF), per tal d'avaluar l'efecte dels diferents tractaments. La IRF es va calcular amb la següent fórmula:

$$IRF = \frac{MIF (\text{Compost testat}) - MIF (\text{Control negatiu})}{MIF (\text{Control negatiu})} \times 100$$

A causa que en l'anàlisi de producció de ROS, l'emissió de fluorescència no sempre presentava una distribució normal, els valors de les MIF d'aquest apartat corresponen a medianes en comptes de mitjanes.

Resultats

1. Caracterització de les línies cel·lulars

1.1. Citomorfologia

Per a la caracterització de les cèl·lules es van obtenir imatges per microscòpia òptica dels models cel·lulars utilitzats. La línia I83 presenta cèl·lules arrodonides i regulars, que creixen disperses o en petits clústers en suspensió. Presenten algunes vesícules al citoplasma, i nuclis també arrodonits i regulars (**Figura 18 A**). La línia Mec1 està formada per cèl·lules que presenten una morfologia relativament irregular, amb presència d'algunes cèl·lules aberrants, i que creixen aïllades i presenten una certa adherència (**Figura 18 B**). Les cèl·lules de la línia EHEB presenten una morfologia entre arrodonida i poligonal, amb certes irregularitats observables de la membrana plasmàtica i presència d'algunes vesícules al citoplasma (**Figura 18 C**).

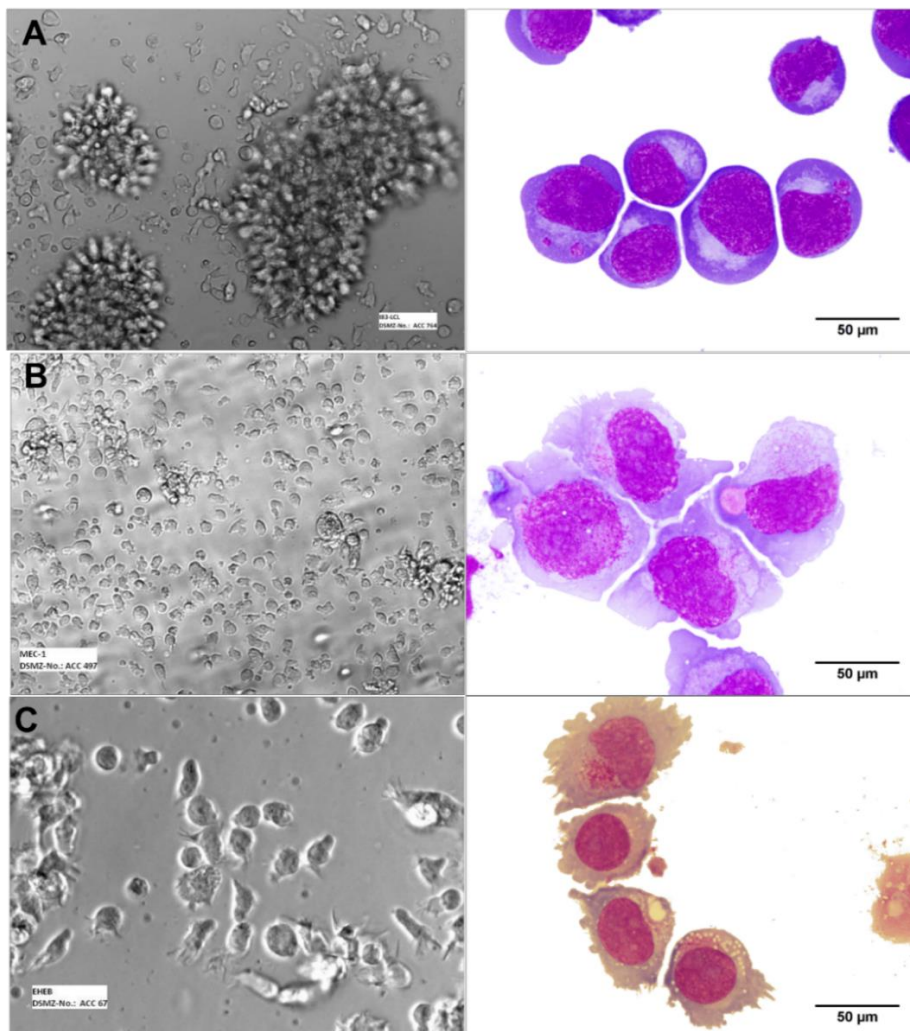


Figura 18: Imatges de microscòpia de les línies cel·lulars I83, Mec1 i EHEB. A l'esquerra, imatges de microscopi de contrast de fase obtingudes de la base de dades de la DSMZ, i a la dreta, imatges de microscòpia òptica utilitzant tinció May Grünwald-Giemsa obtingudes al propi laboratori (100X). A, I83; B, Mec1; C, EHEB.

1.2. Immunofenotip

Tot i que l'immunofenotip de les línies cel·lulars utilitzades està ben descrit, es va procedir a realitzar un immunofenotipatge d'alguns marcadors de referència en la LLC per tal de verificar si els expressaven. A continuació es mostra una taula amb els resultats obtinguts (**Taula 3**).

Taula 3: Immunofenotip de les línies cel·lulars de LLC utilitzades.

| | CD5 | CD19 | CD38 | CD20 |
|------|-----|------|------|------|
| I83P | + | + | + | + |
| I83 | + | + | + | |
| Mec1 | - | + | + | + |
| EHEB | - | + | + | + |

1.3. Anàlisi del cicle cel·lular

Amb l'anàlisi del cicle cel·lular i de la ploïdia, es va observar que les I83 i les Mec1 eren tetraploides, i que les EHEB eren diploides (**Figura 19**). Aquests resultats coincideixen amb el que hi ha prèviament descrit d'aquestes línies cel·lulars, excepte en el cas de Mec1, que consten com a majoritàriament quasidiploides, tot i que amb força heterogeneïtat i al voltant d'un 10% de poliploïdia.

Es mostra també el cicle cel·lular d'una subpoblació diploide de les I83, el procés d'obtenció de la qual es descriu en el següent apartat.

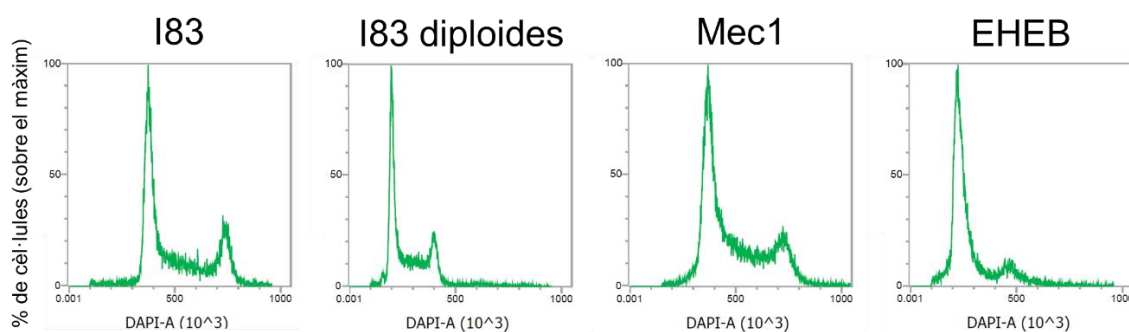


Figura 19: Perfil de cicle cel·lular de les diferents línies cel·lulars utilitzades. Es pot observar, en funció de la situació en l'eix d'abscisses del pic major, corresponent a les cèl·lules en fase G0G1, com les línies I83 i Mec1 són tetraploides, mentre que EHEB i la sublínia derivada de I83 són diploides.

1.4. Anàlisi de clonalitat

Com a conseqüència de la positivitat per micoplasma de la línia I83, es va procedir a fer un assaig de dilució límit en placa de 96 pouets amb la finalitat d'aconseguir la descontaminació.

Dels diversos subcultius obtinguts, es va començar a treballar amb un d'ells, lliure de contaminació. Transcorregut un temps d'expansió del cultiu, l'anàlisi de la ploïdia va revelar que la nova línia era diploide (**Figura 20 A**). Després de diferents passis, l'anàlisi de la ploïdia va revelar un augment del pic 4n i l'aparició d'un tercer pic 8n, indicant una tetraploïdització del model cel·lular (**Figura 20 B i C**). Després d'uns tres mesos de cultiu, es va observar que el pic 4n augmentava fins a superar la població diploide inicial (**Figura 20 D**). Passats 3 mesos més, el pic diploide acabava sent aparentment indetectable i s'observava una població 4n homogènia (**Figura 20 E**). Tot i que no hi ha gaire bibliografia relativa a la línia I83, a la base de dades de la DSMZ hi consta com a hipotetraploide¹⁸⁴, coincidint amb el que s'havia observat en la línia original, prèviament a la realització de la dilució límit.

El procés de tetraploïdització es va poder replicar en un cultiu independent de I83 diploides. En canvi, es van repetir dilucions límit de les I83 tetraploides, i de les 10 subpoblacions obtingudes, cap va ser diploide.

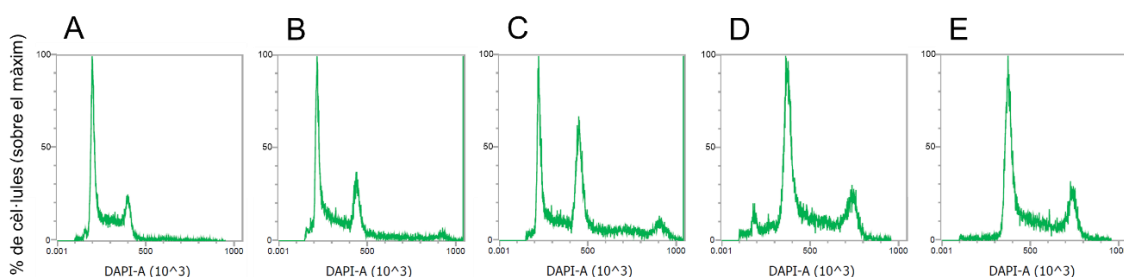


Figura 20: Procés de tetraploïdització de la sublínia I83 diploide. Inicialment, la sublínia de I83 obtinguda per dilució límit era uniformement diploide, fins que va aparèixer un petit pic 8n indicatiu de la presència de cèl·lules tetraploides. Al llarg d'un període d'aproximadament 9 mesos es va poder observar un augment progressiu de la població tetraploide fins acabar substituint la població diploide inicial, que va acabar sent indetectable.

El cariotip de les línies diploide i tetraploide va permetre demostrar la composició per dues clones diferents, de 45 cromosomes i 88-90 cromosomes, en proporcions variables. La població aparentment diploide estava composta majoritàriament per la clona hipodiploide de 45 cromosomes (39 metafases sobre 50), mentre que la línia aparentment tetraploide estava composta majoritàriament per la clona de 88 cromosomes (22 metafases sobre 41). Es detectava una delecció estructural de 2p i 18p, i les fórmules de les dues clones majoritàries eren, respectivament, 45,X,-Y,del(2)(p21p23),del(18)(p11.1) i 88-90,XX,-Y,-Y,del(2)(p21p23)x2,del(18)(p11.1)x2 (**Figura 21**).

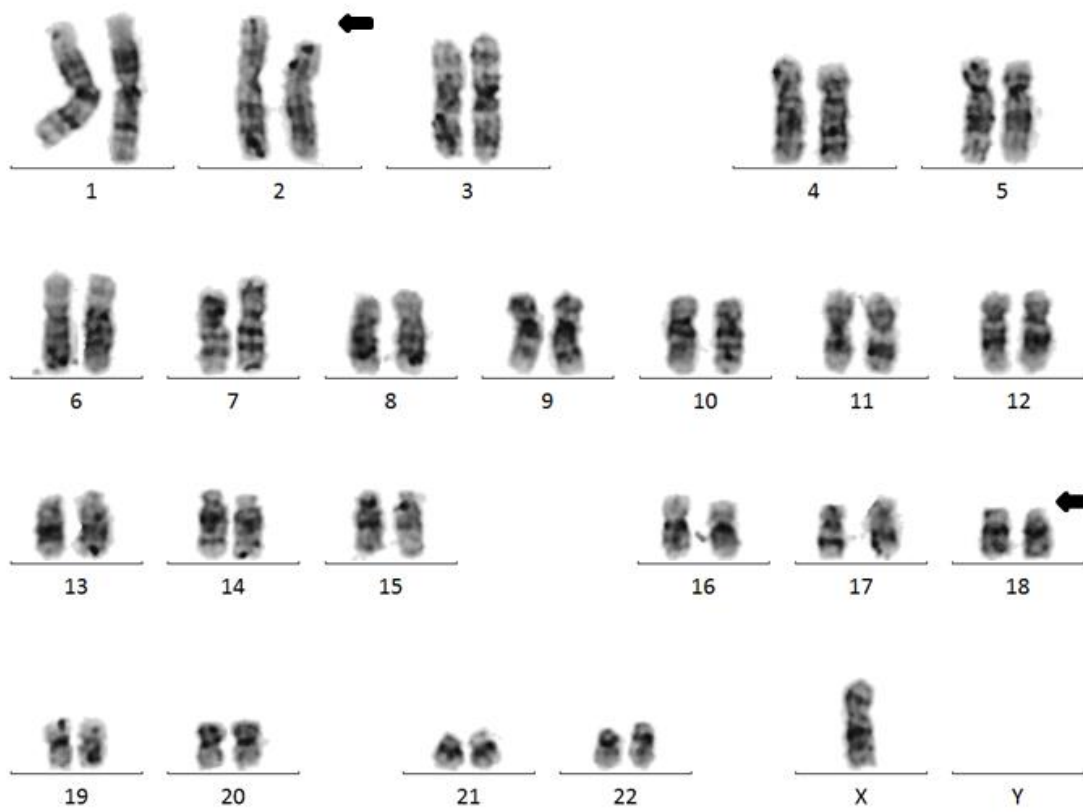


Figura 21: Cariotip de les cèl·lules I83 diploides. Les fletxes indiquen les delecions en 2p i 18p.

2. Anàlisi de l'efecte sinèrgic de la curcumina sobre els fàrmacs

2.1. Controls i curcumina

Per a la posterior valoració de l'efecte dels fàrmacs i de la seva combinació amb la curcumina, es va començar analitzant l'estat basal de les cèl·lules en absència de tractament (incubació amb DMSO) i tractades amb curcumina 5 μ M.

En primer lloc, es va avaluar la integritat de la membrana cel·lular, paràmetre que està associat a la viabilitat cel·lular. Tot i que es van realitzar anàlisis a 0, 24, 48 i 72 hores d'incubació, per facilitar la comprensió dels resultats només es mostren els resultats de les 72 hores, ja que hi ha coherència entre tots els temps estudiats i en general aquest és el més representatiu i permet avaluar objectivament l'efecte dels fàrmacs. En primer lloc es mostren els resultats obtinguts en els controls negatius, i posteriorment es presenten els resultats obtinguts en presència de curcumina.

Es va poder observar que en absència de tractament, les I83 tenien molt conservada la integritat de la membrana cel·lular a les 72 hores (superior al 95%) (**Figura 22**), el que seria indicatiu d'una propagació òptima del cultiu cel·lular. Les Mec1 assolien uns valors més baixos, al voltant del 90% (**Figura 22**). Cal remarcar que aquestes cèl·lules presenten una certa adherència, el que influeix en la viabilitat basal perquè dificulta el manteniment de les cèl·lules en cultiu, alhora que fa necessària la utilització de l'EDTA per tal de desenganxar-les i mantenir l'homogeneïtat del cultiu cel·lular. Les cèl·lules de la línia EHEB van ser les que presentaven uns percentatges més baixos de viabilitat basal, entre un 70 i un 80% (**Figura 22**).

La curcumina 5 μ M va reduir mínimament la viabilitat basal en les I83 i les Mec1 a les 72 hores (**Figura 22**). Tot i que va tenir un efecte significatiu en les I83, aquest va ser molt moderat. En les EHEB, la curcumina va augmentar de forma significativa el percentatge de cèl·lules afectades, en un 5% aproximadament (**Figura 22**).

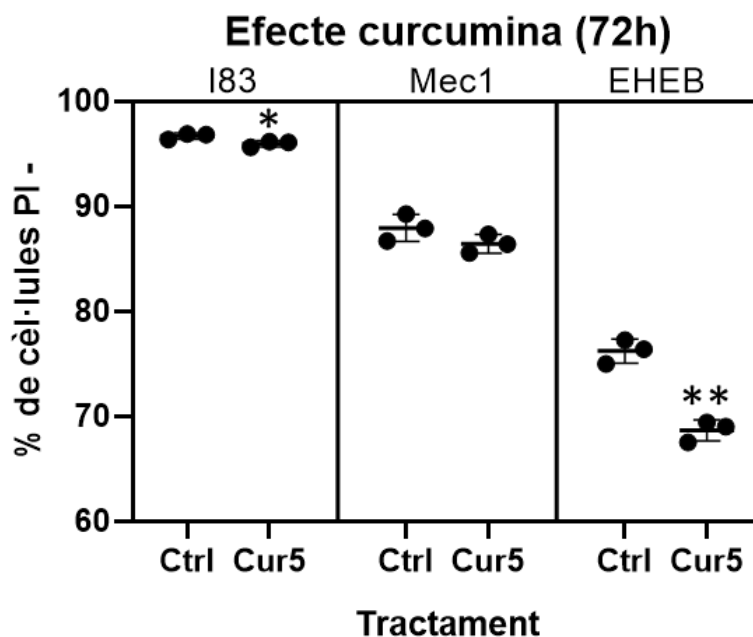


Figura 22: Efecte de la curcumina a les 72 hores d'incubació sobre la integritat de la membrana cel·lular. La curcumina va produir un efecte citotòxic lleu però significatiu en I83 i EHEB. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Simultàniament, es va valorar la proliferació cel·lular, tenint en compte l'increment al llarg del temps de la concentració cel·lular, calculada amb el sistema de recompte absolut del citòmetre de flux. Ens tots els casos es partia de 50 cèl·lules/ μ L, la concentració de sembra.

Es va observar que la proliferació cel·lular guardava relació amb la integritat de membrana. Així, les I83 van ser les que proliferaven més, arribant a valors propers a les 800 cèl·lules/ μ L a les 72 hores (**Figura 23 A**). Les Mec1 van presentar una proliferació menor, arribant a unes 400 cèl·lules/ μ L (**Figura 23 B**). Finalment, les EHEB van ser les que van presentar una proliferació més baixa, superant per poc les 100 cèl·lules/ μ L (**Figura 23 C**).

La curcumina va produir un bloqueig de la proliferació significatiu en totes tres línies tal i com es pot observar en l'evolució del recompte de cèl·lules al llarg del temps. (**Figura 23 A, B i C**).

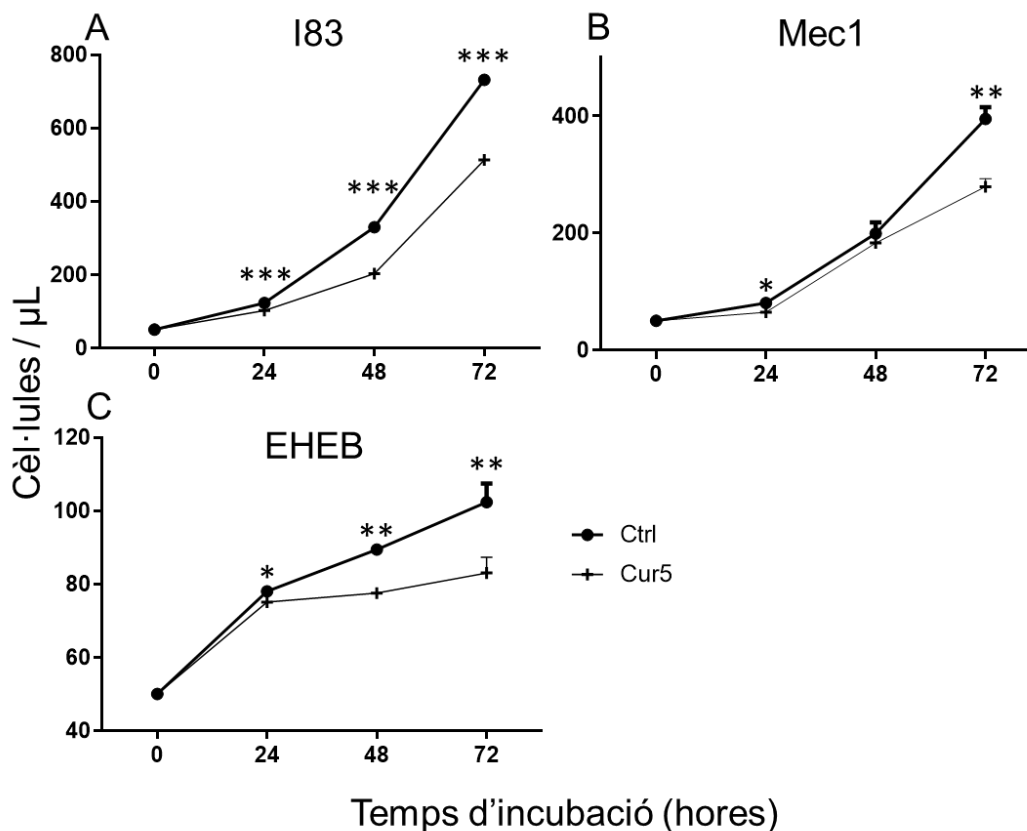


Figura 23: Efecte de la curcumina sobre la proliferació cel·lular. La curcumina 5 µM va reduir significativament la proliferació de totes tres línies cel·lulars. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa al cicle cel·lular, com s'ha comentat a *Material i mètodes*, es va calcular la ràtio (S + G2M) / G0G1, que indica la proporció de cèl·lules en síntesi i divisió respecte a les que estan en fase G0G1.

Les I83 en el control tenien una ràtio lleugerament menor que 1 a les 24 hores (de 0,8), i que augmentava amb el temps (fins a 1,2 a les 72 hores) (**Figura 24 A**). Les Mec1 tenien una ràtio molt elevada a les 24 hores, al voltant de 1,6, que va disminuir fins a 1 a les 72 hores (**Figura 24 B**). Pel que fa a les EHEB, a les 24 hores tenien una ràtio de 1,2 i va disminuir lleugerament fins a 0,9 a les 72 hores (**Figura 24 C**).

La curcumina va incrementar significativament la ràtio (S + G2M) / G0G1 en les I83 i les Mec1 a les 24 hores (**Figura 24 A i B**). En les EHEB s'observava el mateix efecte, sobretot a les 72 hores, tot i que en aquest cas no va ser significatiu (**Figura 24 C**). Aquest augment de la ràtio produït per la curcumina no és atribuïble a un increment de la proliferació, sinó més aviat a un bloqueig de les cèl·lules en les fases S o G2M. L'efecte observat en I83 i Mec1 a les 24 hores va disminuir amb el temps, i fins i tot es va assolir l'efecte contrari, a les 48 hores en Mec1 i a les 72 hores en I83, amb una reducció del percentatge de cèl·lules en S o G2M en relació al control (**Figura 24 A**). Aquest fet podria ser atribuïble a la mort d'una part de les cèl·lules bloquejades.

També es va avaluar cada fase del cicle cel·lular per separat a cada temps d'incubació. Els resultats es mostren de forma concisa en una taula (**Taula 4**), indicant únicament si el tractament produïa un increment o una disminució significatiu del percentatge de cèl·lules en cada fase. S'indiquen només els efectes en S i G2M, ja que els canvis en G0G1 responen bàsicament al bloqueig de cèl·lules en les altres dues fases.

Es va observar que l'efecte de la curcumina es va produir sobre la fase S, i que G2M no variava significativament (**Taula 4**). A les 72 hores hi havia un bloqueig significatiu en fase S en EHEB, que no es detectava amb la ràtio (S + G2M) / G0G1. En I83 i Mec1, el bloqueig en fase S es va produir a les 24 hores ($P < 0,005$), mentre que a temps més llargs d'incubació es produïa una disminució significativa del percentatge de cèl·lules en aquesta fase en comparació amb el control. Aquests resultats mostren que la curcumina té un efecte disruptor del cicle cel·lular, produint un bloqueig en fase de síntesi (fase S) per aquests models cel·lulars.

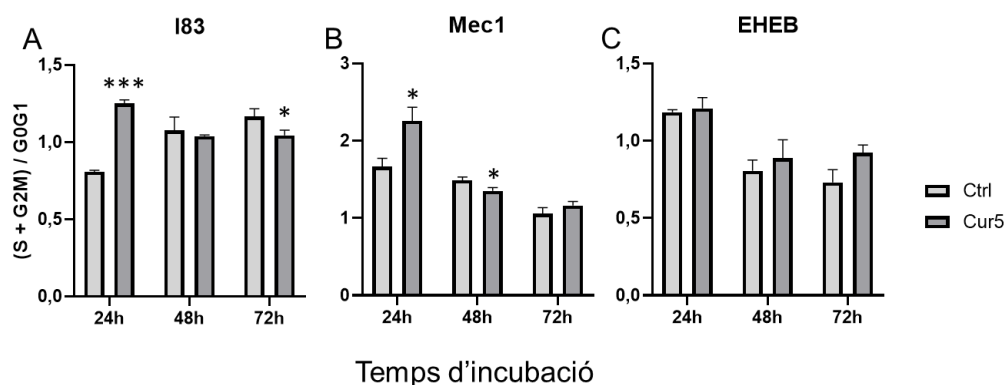


Figura 24: Efecte de la curcumina sobre la ràtio (S + G2M) / G0G1. La curcumina va produir un augment significatiu de la ràtio en I83 i Mec1 a les 24 hores. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula 4: Efecte de la curcumina sobre les fases S i G2M.

| Curcumina | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| 24h | +++ | / | ++ | / | / | / |
| 48h | - | / | - | / | / | / |
| 72h | -- | / | + | / | + | / |

S'indica si la curcumina va produir un increment del percentatge de cèl·lules (+) o una disminució (-) respecte al control. / $P > 0,05$; + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$.

Finalment, es va avaluar al microscopi òptic la citomorfologia de les diferents línies i els canvis que generaven els tractaments sobre aquesta. En aquest apartat es descriuen els efectes observats i s'acompanya d'algunes imatges representatives, seleccionant aquelles en què es poden observar millor els efectes descrits.

En el cas dels controls, i com a recordatori, amb l'anàlisi per microscòpia es va observar que les I83 són cèl·lules regulars i arrodonides en general, amb nuclis també arrodonits i regulars i que creixen disperses o en petits clústers en suspensió (**Figura 25 A**). S'observen petites vesícules al citoplasma, així com cèl·lules en divisió amb relativa freqüència. Pel que fa a les Mec1, són cèl·lules força irregulars (**Figura 25 C**), amb presència d'algunes cèl·lules aberrants (com per exemple, de mida gran, amb deformacions de nucli). Finalment, les EHEB són cèl·lules arrodonides o poligonals, amb un contorn de la membrana irregular i amb presència de vesícules al citoplasma (**Figura 25 E**).

La curcumina va incrementar la presència de cèl·lules més grans del normal i amb deformitats de nucli (com ara lobulacions o cèl·lules polinucleades) en les I83 (**Figura 25 B**), amb una incidència que augmentava a temps més llargs d'incubació (24 h < 48 h < 72 h). En les Mec1 va produir una fragmentació del nucli en algunes cèl·lules a les 24 hores (**Figura 25 D**). També es podia observar la presència d'alguna cèl·lula amb deformacions de nucli, i a les 48 hores s'observava una disminució de la concentració cel·lular i un nombre relativament elevat de cossos apoptòtics. A les 72 hores s'observava una relativa disminució de cèl·lules amb morfologia aberrant, mentre que la resta semblaven més regulars. En les EHEB no es van detectar efectes morfològics produïts per la curcumina (**Figura 25 F**).

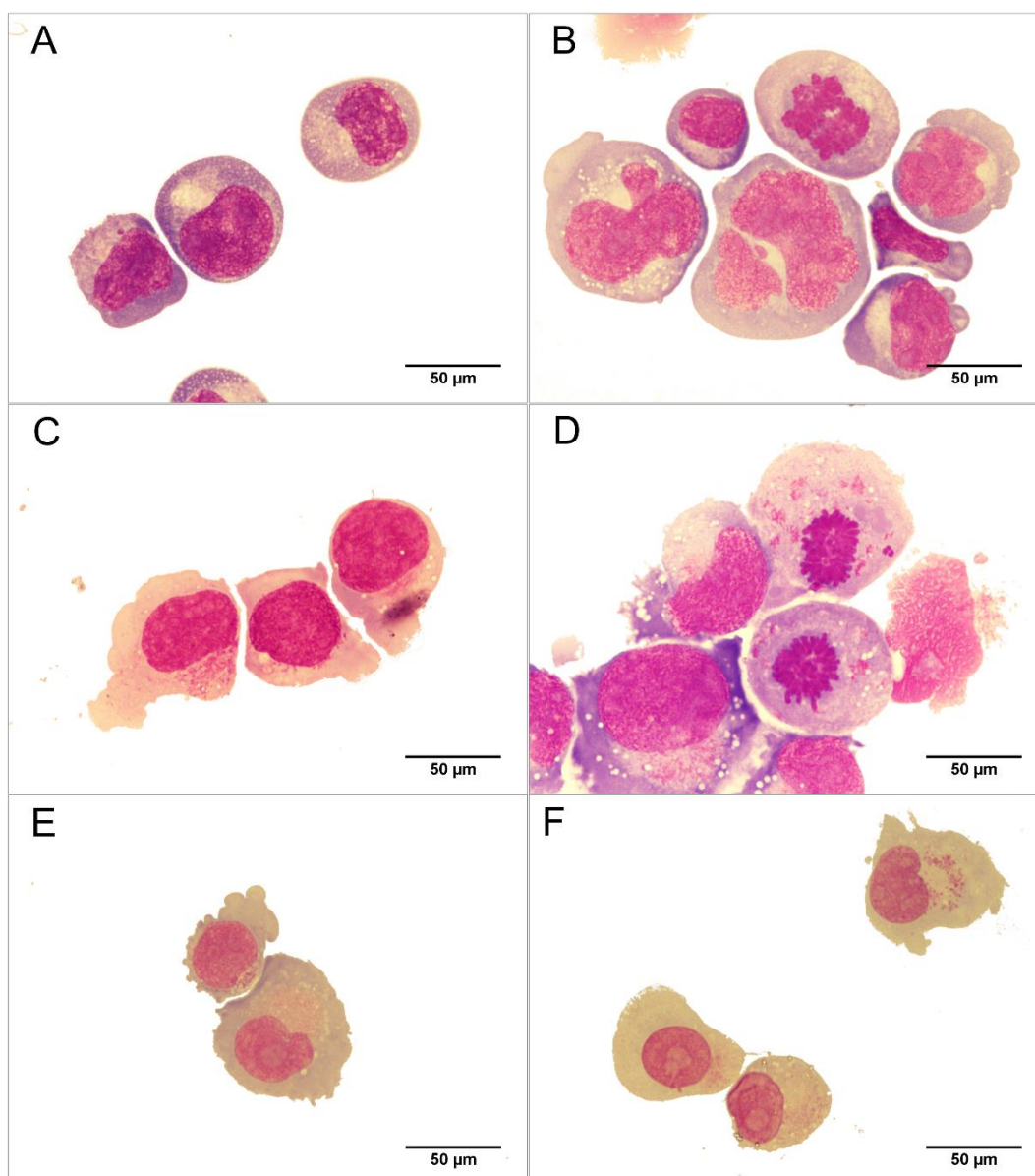


Figura 25: Efectes de la curcumina 5 μM sobre la citomorfologia de les línies cel·lulars (100X). A Control I83 24 h; B Curcumina I83 72 h; C Control Mec1 48 h; D Curcumina Mec1 24 h; E Control EHEB 48 h; F Curcumina EHEB 48 h.

2.2. Etopòsid

Una vegada avaluat l'estat dels controls i l'efecte de la curcumina, es va procedir a estudiar l'efecte de diferents fàrmacs i de la seva combinació amb curcumina. Per facilitar la comprensió dels gràfics, únicament s'ha indicat amb asteriscs el nivell de significació de l'efecte combinatori de la curcumina respecte al fàrmac sol, principal objecte d'aquesta Tesi. La significança de l'efecte dels fàrmacs respecte al control, així com la totalitat dels resultats numèrics obtinguts en els assaigs de citotoxicitat, es troben indicats a la **Taula suplementària 1**, **Taula**

suplementària 2, Taula suplementària 3 i Taula suplementària 4 de Material suplementari.

El tractament amb etopòsid 0,1 μ M va tenir poc efecte a les 72 hores sobre la integritat de la membrana cel·lular en I83 i Mec1 (increment de l'afectació inferior a un 1%), no així en EHEB, en què va produir un increment de més d'un 5% de cèl·lules afectades (**Figura 26**).

La combinació amb curcumina va incrementar significativament la disrupció de la membrana en totes tres línies. En les I83 va produir un increment moderat però clarament significatiu ($P < 0,0005$), que responia a un efecte additiu (CDI = 0,98). En les Mec1 es va produir un increment considerable i significatiu del mateix efecte, aproximadament d'un 10%. L'efecte va ser lleugerament sinèrgic (CDI = 0,91). Cap dels dos compostos va demostrar un efecte significatiu sobre la disrupció de la membrana cel·lular per separat. En les EHEB també es va observar una potenciació, amb un efecte additiu (CDI = 0,99) (**Figura 26**).

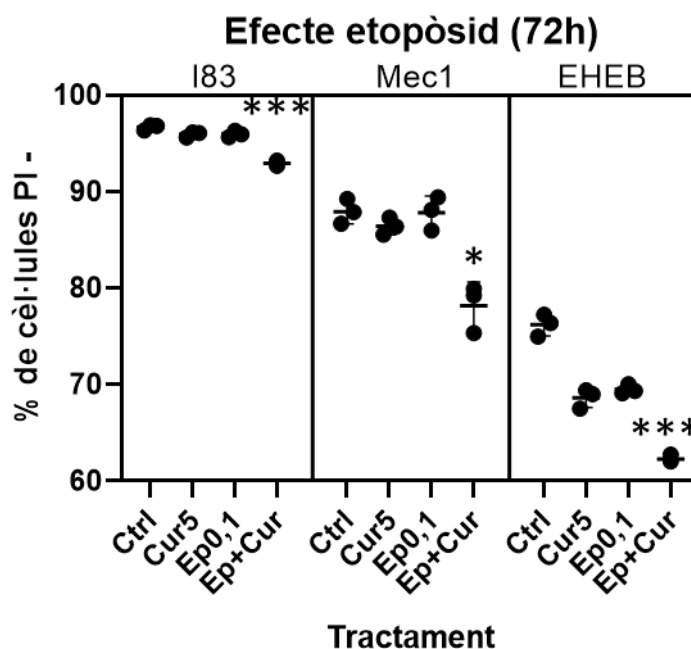


Figura 26: Efecte de l'etopòsid a les 72 hores d'incubació sobre la integritat de la membrana cel·lular i efecte sinèrgic de la curcumina. La curcumina va tenir un efecte potenciador de l'etopòsid significatiu en comparació al fàrmac tot sol en totes tres línies cel·lulars. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Els efectes de l'etopòsid van ser molt més evidents en el bloqueig de la proliferació cel·lular, produint en totes tres línies una reducció de la proliferació (**Figura 27 A, B i C**). En les tres línies, la combinació amb curcumina va contribuir a reduir encara més la proliferació cel·lular, de forma significativa (**Figura 27 A, B i C**). És important recordar que la curcumina per sí sola ja produïa un bloqueig de la proliferació, arribant a superar l'efecte de l'etopòsid en el cas de les I83 (**Figura 27 A**).

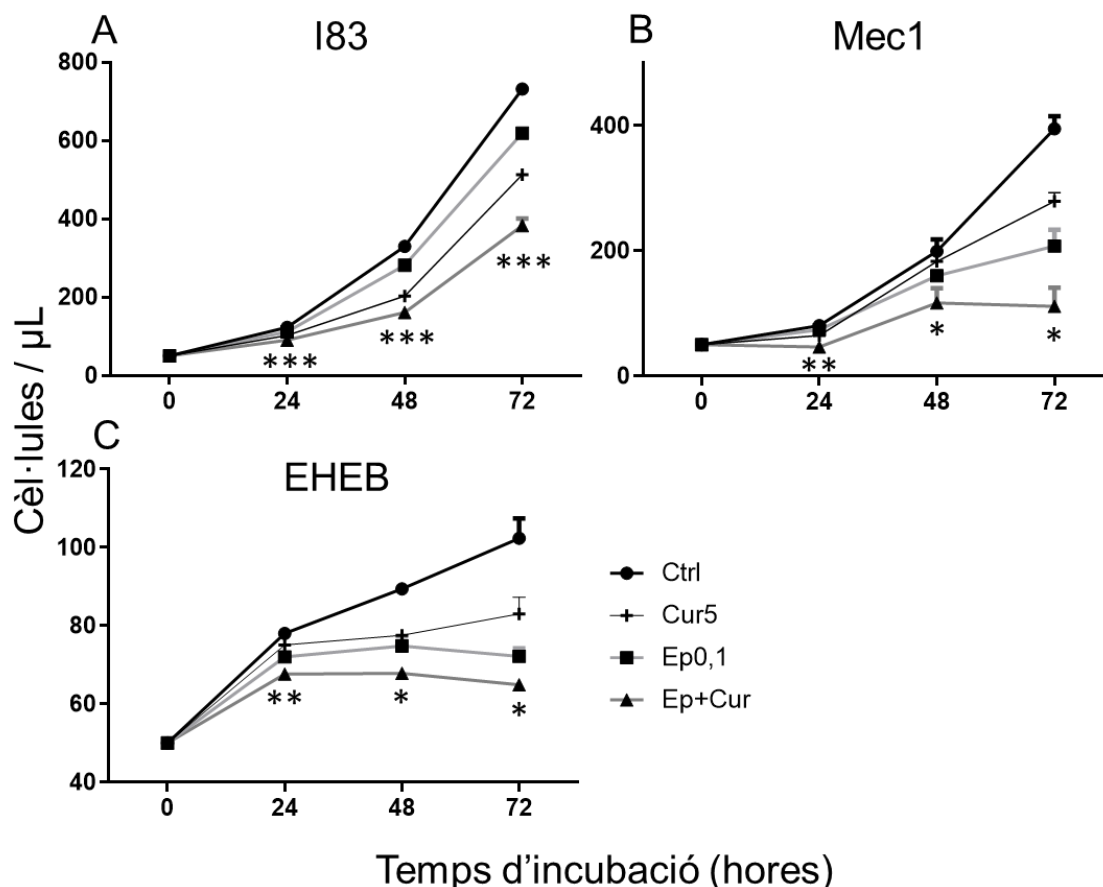


Figura 27: Efecte de l'etopòsid sol i en combinació amb la curcumina sobre la proliferació cel·lular. L'etopòsid va reduir la proliferació cel·lular en totes tres línies, i va ser potenciat significativament per la curcumina. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa al cicle cel·lular, l'etopòsid va produir un increment de la ràtio (S + G2M) / G0G1 en les tres línies (**Figura 28 A, B i C**), que va ser significatiu en Mec1 (24 h) (**Figura 28 B**) i en EHEB (48 i 72 h) (**Figura 28 C**). La combinació amb curcumina no va tenir un efecte significatiu sobre l'etopòsid en cap de les tres línies (**Figura 28 A, B i C**).

Estudiant les fases del cicle cel·lular per separat, es va observar que l'etopòsid produïa el bloqueig de forma significativa en fase G2M en totes tres línies cel·lulars (**Taula 5**). L'etopòsid no va produir un efecte significatiu sobre la fase S en I83 ni en EHEB, només en Mec1 va produir una certa reducció del percentatge de cèl·lules en aquesta fase a les 48 i 72 hores (**Taula 5**).

La combinació amb curcumina va produir en Mec1 (24 h) i en EHEB (72 h) un bloqueig en fase S, que va reduir l'acumulació de cèl·lules en fase G2M que produïa l'etopòsid per sí sol (**Taula 5**). En I83, la curcumina no va produir cap efecte significatiu sobre el cicle cel·lular (**Taula 5**).

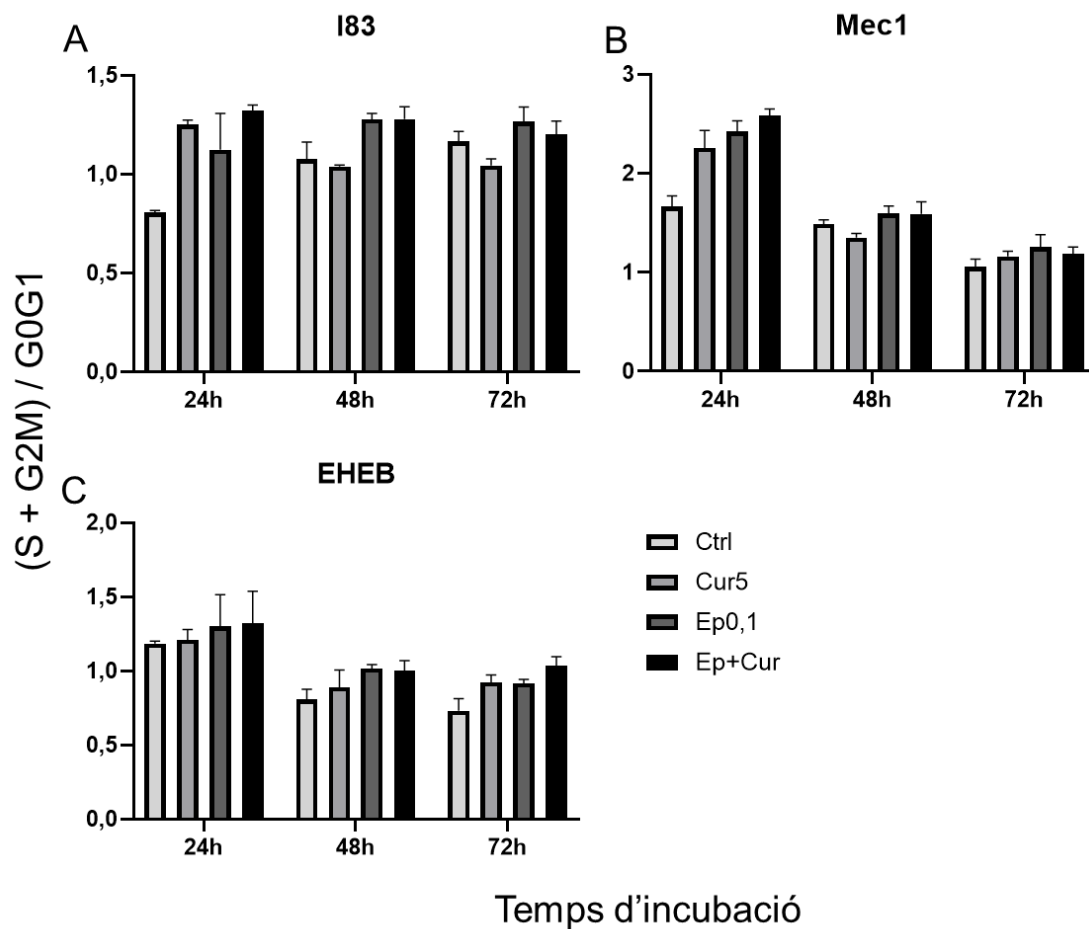


Figura 28: Efecte de l'etopòsid sol i en combinació amb la curcumina sobre la ràtio (S + G2M) / G0G1. L'etopòsid va produir un increment de la ràtio en totes tres línies cel·lulars. La combinació amb la curcumina no va produir canvis significatius en aquest efecte. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula 5: Efecte de l'etopòsid sol o en combinació amb la curcumina sobre les fases S i G2M.

| Etopòsid | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|-------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| 24h | / | ++ | / | ++ | / | / |
| 48h | / | ++ | --- | ++ | / | + |
| 72h | / | / | - | + | / | ++ |
| +Cur | | | | | | |
| 24h | / | / | +++ | --- | / | / |
| 48h | / | / | / | / | / | / |
| 72h | / | / | ++ | / | ++ | - |

S'indica si es va produir un increment del percentatge de cèl·lules (+) o una disminució (-), en comparació al control, en el cas de l'etopòsid; i en comparació a l'etopòsid sol, en el cas de l'etopòsid combinat amb curcumina. / $P > 0,05$; + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$.

Pel que fa a la citomorfologia, en les I83 es va observar que l'etopòsid 0,1 μM , a partir de les 48 hores d'incubació, produïa alteracions de la morfologia cel·lular, polinucleació i fragmentació de nucli i aparició massiva de vesícules en algunes cèl·lules (**Figura 29 A**). A les 24 hores no s'observava cap efecte citomorfològic, mentre que a les 72 hores, les cèl·lules presentaven més alteracions observables que a les 48 hores. La combinació amb curcumina 5 μM va incrementar la severitat de l'efecte de l'etopòsid, amb alteracions del nucli i polinucleació a les 72 hores d'incubació (**Figura 29 B**).

En les Mec1, l'etopòsid va permetre observar algunes cèl·lules amb nuclis més grans, amb alteracions morfològiques i polinucleació (**Figura 29 C**). La combinació amb curcumina va anticipar l'entrada en apoptosi de les cèl·lules, i es podien observar cossos apoptòtics amb relativa freqüència ja a les 24 hores (**Figura 29 D**). A més, a les 48 i 72 hores incrementava el percentatge de cèl·lules amb nuclis més grans i amb aberracions, polinucleades o apoptòtiques.

En les EHEB l'etopòsid va permetre observar cèl·lules amb nuclis aberrants i polinucleades (**Figura 29 E**) a partir de les 48 hores. A les 72 hores es començava a veure un nombre relativament elevat de cèl·lules amb importants aberracions i una minoria de cossos apoptòtics sobre l'extensió total de la preparació. Amb la combinació amb curcumina es va observar un increment de cossos apoptòtics i cèl·lules amb danys ja a les 24 hores. A les 48 hores s'observava que moltes de les cèl·lules presentaven característiques citomorfològiques d'apoptosi, amb una menor freqüència de cèl·lules polinucleades en comparació amb el tractament amb etopòsid sol. Finalment, a partir de les 48 hores, i especialment a les 72 hores, es va observar compactació de la cromatina nuclear i cèl·lules molt aberrants, amb gran vacuolització (**Figura 29 F**).

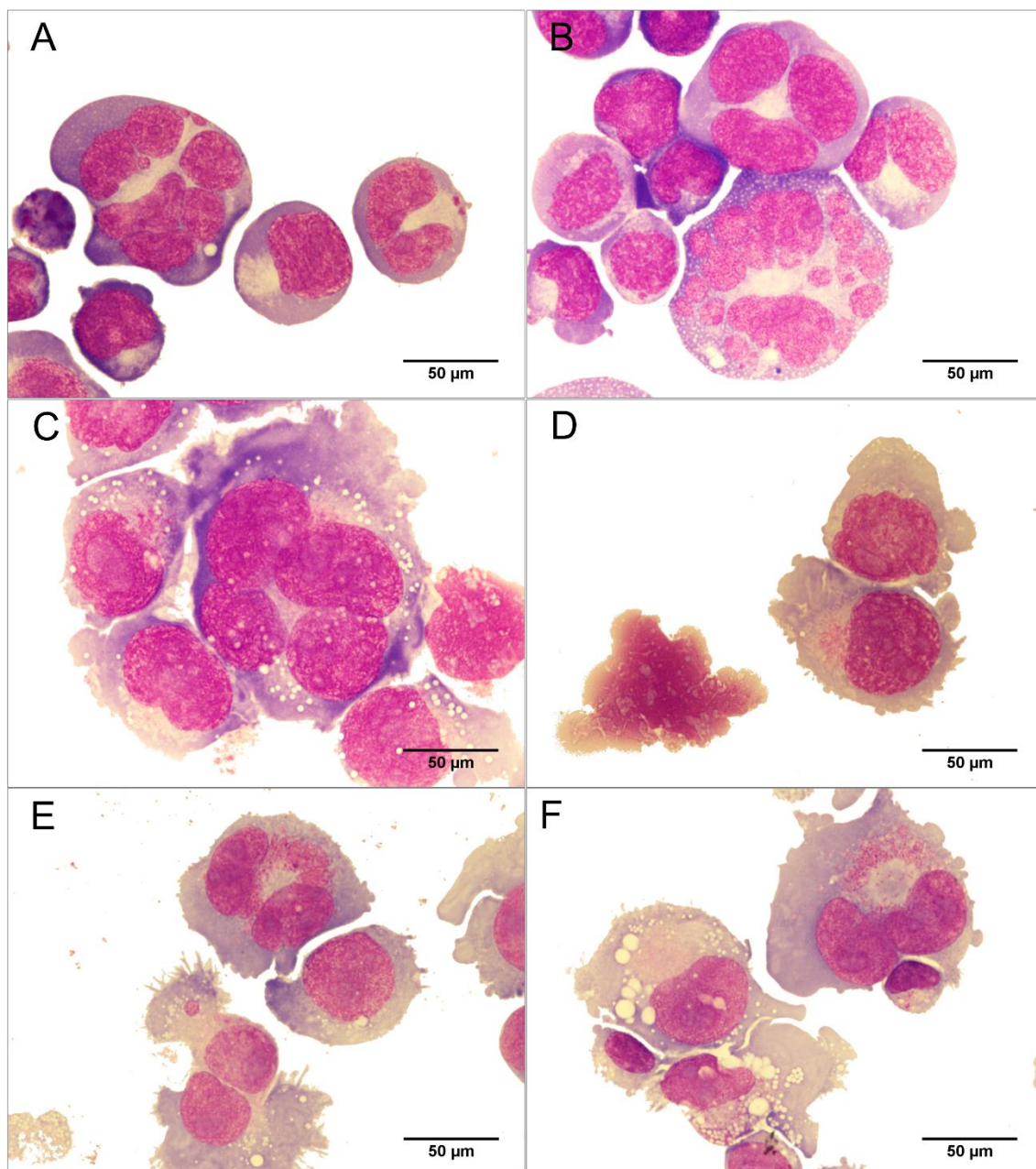


Figura 29: Efectes de l'etopòsid 0,1 µM sobre la citomorfologia (100X). A Etopòsid I83 72 h; B Etopòsid + Curcumina I83 72 h; C Etopòsid Mec1 24 h; D Etopòsid + Curcumina Mec1 24 h; E Etopòsid EHEB 72 h; F Etopòsid + Curcumina EHEB 48 h.

2.3. Camptotecina

El tractament amb camptotecina 0,005 µM va produir una important disrupció de la membrana cel·lular en Mec1 i EHEB. En I83, en canvi, va tenir un efecte moderat (**Figura 30**). La combinació amb curcumina 5 µM va potenciar significativament l'efecte en I83 i Mec1, no en EHEB (**Figura 30**). En I83, tant la camptotecina com la curcumina per separat tenien molt poc efecte sobre la disrupció de la membrana cel·lular, en canvi, la combinació dels dos compostos

produïa un efecte sinèrgic considerable (CDI = 0,87). Així mateix, en Mec1 la curcumina per sí sola va tenir poc efecte, mentre que va produir un efecte sinèrgic considerable en combinació amb la camptotecina (CDI = 0,9).

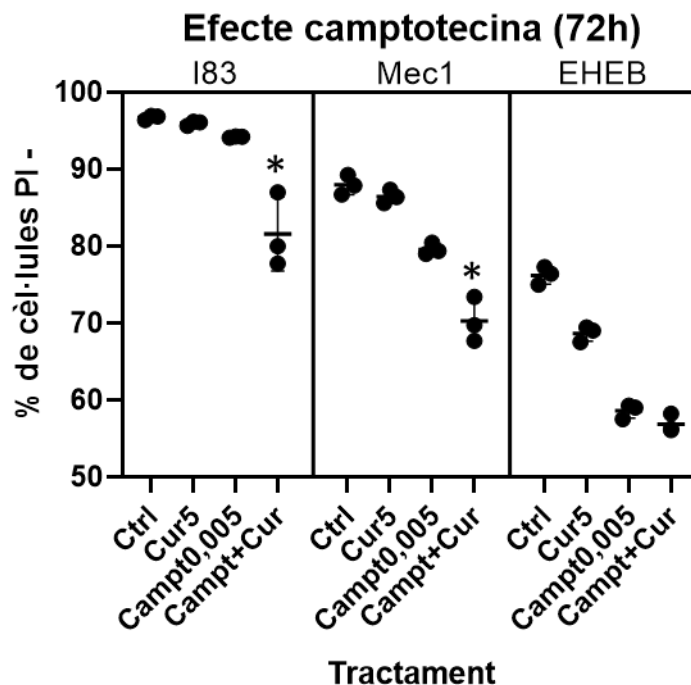


Figura 30: Efecte de la camptotecina a les 72 hores d'incubació sobre la integritat de la membrana cel·lular i efecte sinèrgic de la curcumina. La curcumina va produir un efecte potenciador de la camptotecina significatiu en I83 i Mec1. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa a la proliferació cel·lular, la camptotecina va produir un bloqueig potent en totes tres línies cel·lulars (**Figura 31 A, B i C**). La combinació amb curcumina va potenciar significativament aquest efecte en I83 i Mec1 (**Figura 31 A i B**), però no en EHEB (**Figura 31 C**). La potenciació de l'efecte de la camptotecina produït per la curcumina va ser moderat en les Mec1 i potent en les I83, reduint respectivament la concentració cel·lular a les 72 hores de 150 a 85 cèl·lules/ μ L i de 435 a 165 cèl·lules/ μ L.

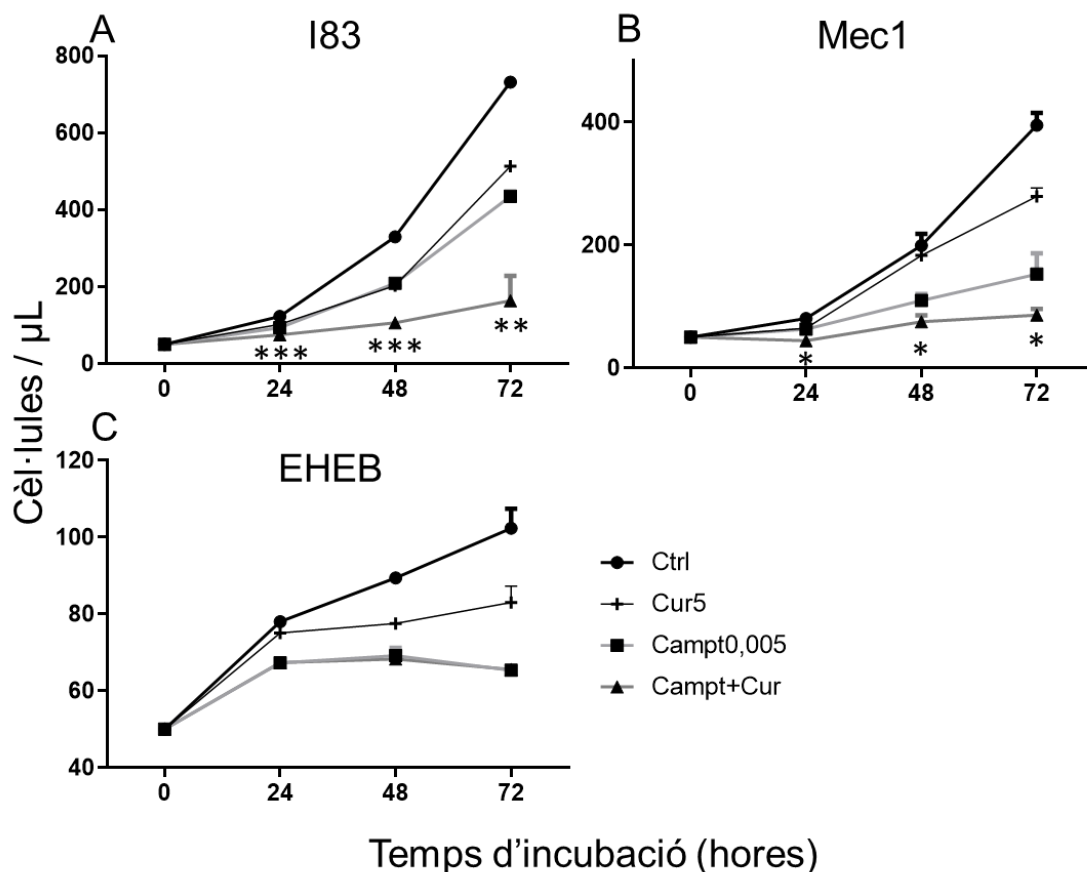


Figura 31: Efecte de la camptotecina sola i en combinació amb la curcumina sobre la proliferació cel·lular. La camptotecina va reduir considerablement la proliferació cel·lular en totes tres línies, i es va veure potenciada significativament per la curcumina en I83 i Mec1. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa al cicle cel·lular, la camptotecina va produir un increment molt important de la ràtio (S + G2M) / G0G1, que es va mantenir al llarg del temps i va ser significatiu per totes tres línies cel·lulars (**Figura 32 A, B i C**). La combinació amb curcumina va incrementar significativament aquest bloqueig en les I83 a les 24 hores (**Figura 32 A**). En les Mec1, la combinació amb curcumina també va tenir un efecte significatiu a les 24 hores, en aquest cas, contrari, produint una reducció de la ràtio (**Figura 32 B**) que podria ser causada per la mort d'una part de les cèl·lules bloquejades.

Analitzant per fases del cicle es va observar que el bloqueig produït per la camptotecina es produïa significativament tant en fase S com G2M, amb variacions entre les línies cel·lulars. La camptotecina va produir un increment significatiu del percentatge de cèl·lules en fase G2M en I83 i Mec1 (a tots els temps) i en EHEB (a les 72 hores); i de S en Mec1 (a tots els temps) i EHEB (a les 48 i 72 hores), no en I83 (**Taula 6**). La combinació amb curcumina va potenciar lleument l'efecte bloquejador de la camptotecina en I83 a les 24 hores, incrementant el percentatge de cèl·lules en fase G2M. Pel que fa a la reducció de la ràtio observada prèviament en Mec1 a les 24 hores, es va produir concretament a la fase G2M (**Taula 6**).

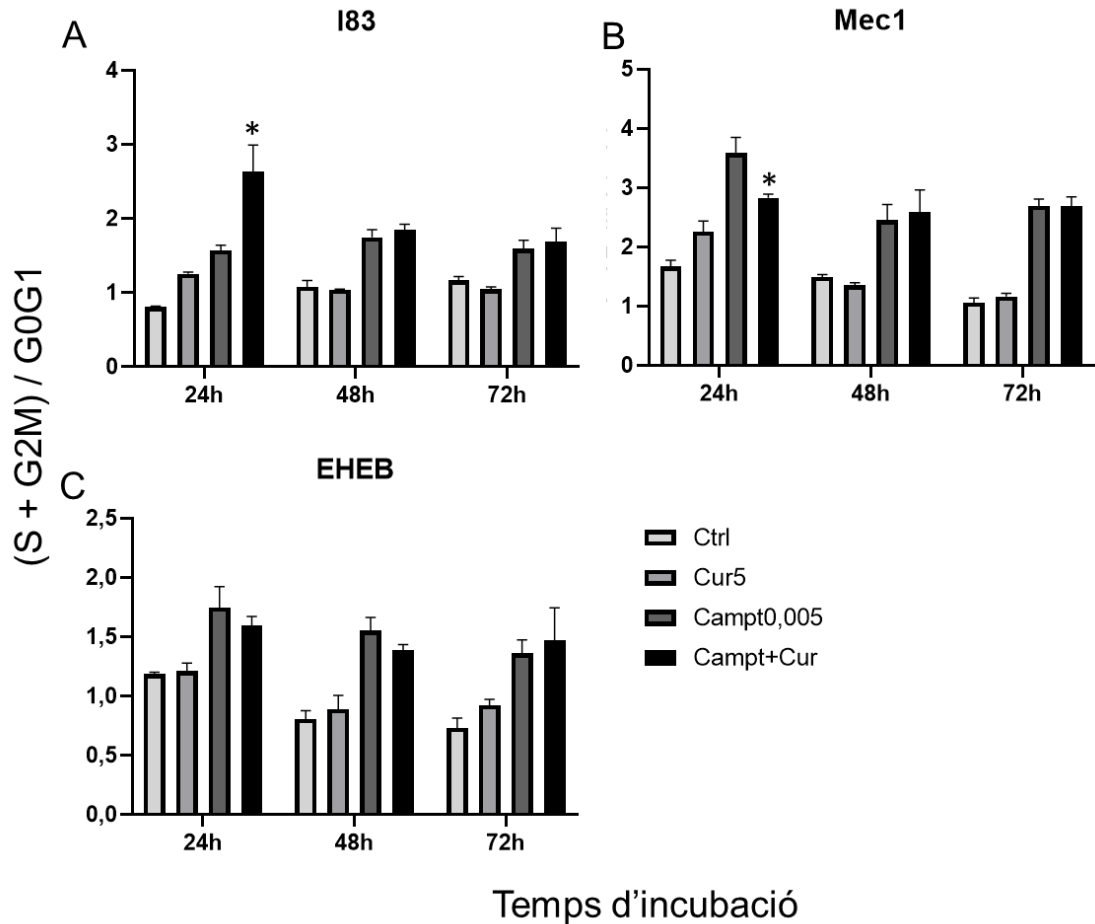


Figura 32: Efecte de la camptotecina sola i en combinació amb la curcumina sobre la ràtio (S + G2M) / G0G1. La camptotecina va produir un increment de la ràtio en totes tres línies cel·lulars. La curcumina va potenciar aquest efecte significativament en I83 i el va reduir significativament en Mec1 a les 24 hores. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula 6: Efecte de la camptotecina sola o en combinació amb curcumina sobre les fases S i G2M.

| Camptotecina | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|--------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| 24h | / | +++ | ++ | + | / | / |
| 48h | / | ++ | ++ | ++ | ++ | / |
| 72h | / | ++ | +++ | +++ | ++ | + |
| +Cur | | | | | | |
| 24h | - | ++ | / | - | / | / |
| 48h | / | / | / | / | / | / |
| 72h | / | / | / | / | / | / |

S'indica si es va produir un increment del percentatge de cèl·lules (+) o una disminució (-), respecte al control, en el cas de la camptotecina; i respecte a la camptotecina sola, en el cas de la camptotecina combinada amb curcumina. / $P > 0,05$; + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$.

Pel que fa a la citomorfologia, la camptotecina va induir alteracions morfològiques de nucli, polinucleació i formació de vesícules al citoplasma en les I83, especialment a partir de les 48 hores (**Figura 33 A**). Amb la combinació amb curcumina es van mantenir els mateixos efectes, amb un lleu increment de les alteracions morfològiques observades (**Figura 33 B**).

En Mec1 també es van detectar cèl·lules amb alteracions de nucli i polinucleació, i algunes amb compactació de la cromatina i característiques de l'apoptosi, també a partir de les 48 hores (**Figura 33 C**). La combinació amb curcumina no va produir cap canvi citomorfològic addicional (**Figura 33 D**).

En EHEB, l'efecte de la camptotecina es va començar a observar a les 48 hores, fent-se evident a les 72 hores. Es van observar cèl·lules més grans, algunes amb més d'un nucli, amb vacuolació (**Figura 33 E**). La combinació amb curcumina no va produir cap efecte citomorfològic evident (**Figura 33 F**). Tanmateix, a les 48 hores ja es començaven a observar força cèl·lules amb alteracions, mentre que en absència de curcumina, no es van observar efectes de manera generalitzada fins a les 72 hores.

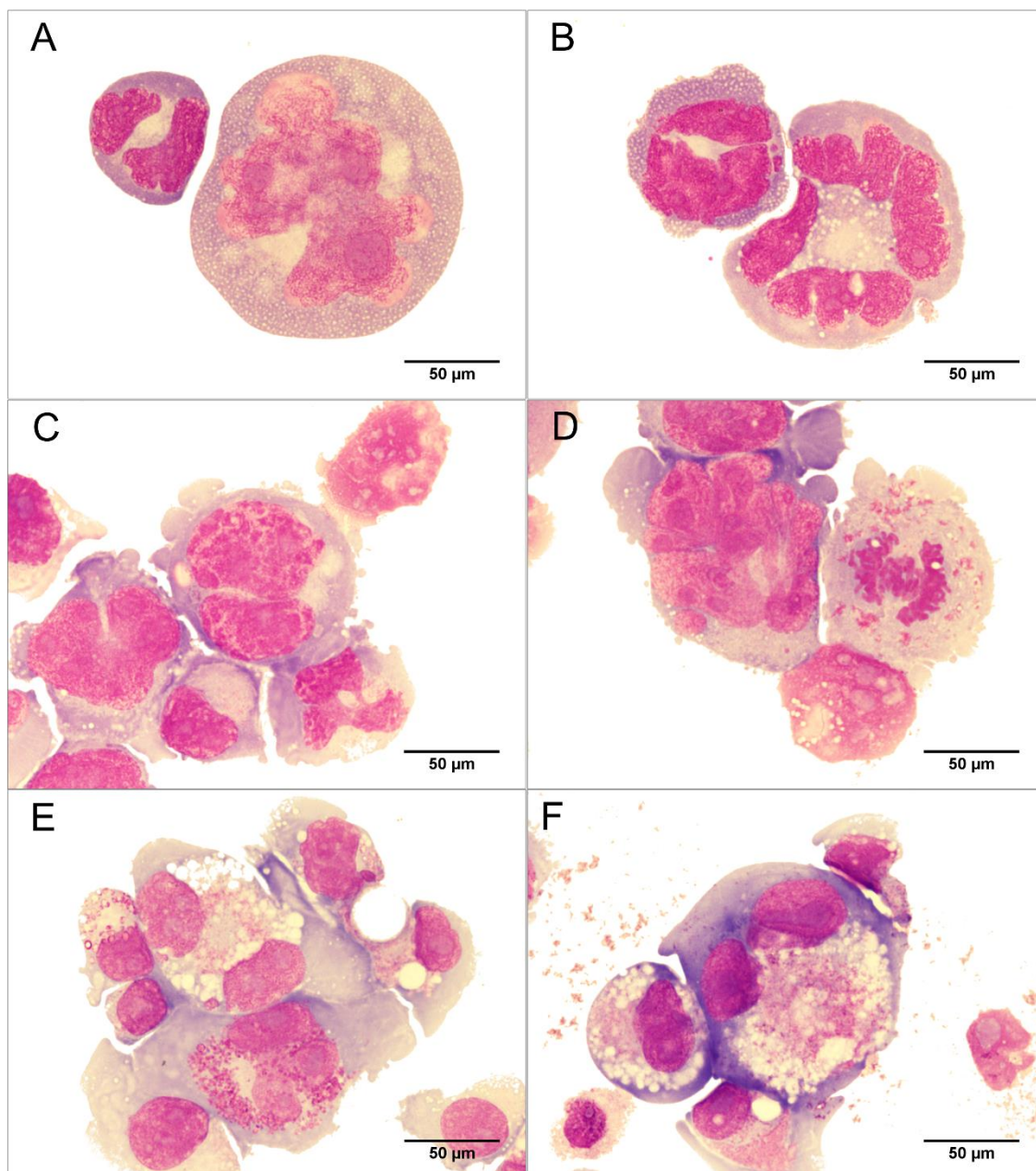


Figura 33: Efectes de la camptotecina 0,005 μM sobre la citomorfologia (100X). A Camptotecina I83 72 h; B Camptotecina + Curcumina I83 72 h; C Camptotecina Mec1 72 h; D Camptotecina + Curcumina Mec1 72 h; E Camptotecina EHEB 72 h; F Camptotecina + Curcumina EHEB 72 h.

2.4. Colquicina

El tractament amb colquicina 0,005 μM va tenir un efecte citotòxic potent sobre les tres línies cel·lulars, produint disrupció de la membrana cel·lular (**Figura 34**) i bloqueig de la proliferació (**Figura 35 A, B i C**). El banc de concentracions realitzat sobre aquests models cel·lulars per determinar la concentració òptima de treball va mostrar que la colquicina presenta un inici abrupte de la toxicitat, produint molt poc efecte a concentracions inferiors a 0,005 μM i una elevada

toxicitat a concentracions superiors, un resultat en correspondència amb l'estret marge terapèutic d'aquest fàrmac.

La combinació de la colquicina amb curcumina 5 μM va produir una potenciació significativa de l'efecte del fàrmac en totes tres línies cel·lulars, tant en la disrupció de la membrana (**Figura 34**) com en el bloqueig de la proliferació (**Figura 35 A, B i C**). La potenciació més destacable es va produir en les Mec1, en què el percentatge de cèl·lules amb la membrana íntegra va disminuir del 73% amb la colquicina sola a un 45% en combinació amb la curcumina (**Figura 34**). Aquest efecte va ser clarament sinèrgic (CDI = 0,68). Pel que fa a la proliferació, en la mateixa línia, l'ús de la colquicina va reduir la concentració cel·lular a les 72 hores de 580 a 350 cèl·lules/ μL , però amb la combinació amb la curcumina, aquesta concentració es va arribar a reduir a unes 100 cèl·lules/ μL (**Figura 35 B**). La combinació amb curcumina va tenir un efecte més moderat en la disrupció de la membrana de les I83 i les EHEB, també significatiu (**Figura 34**). En tots dos casos es va tractar d'un efecte additiu, amb un CDI = 0,95 per les I83 i un CDI = 1,01 per les EHEB. La combinació amb curcumina també va reduir significativament la proliferació en aquestes dues línies cel·lulars (**Figura 35 A i C**).

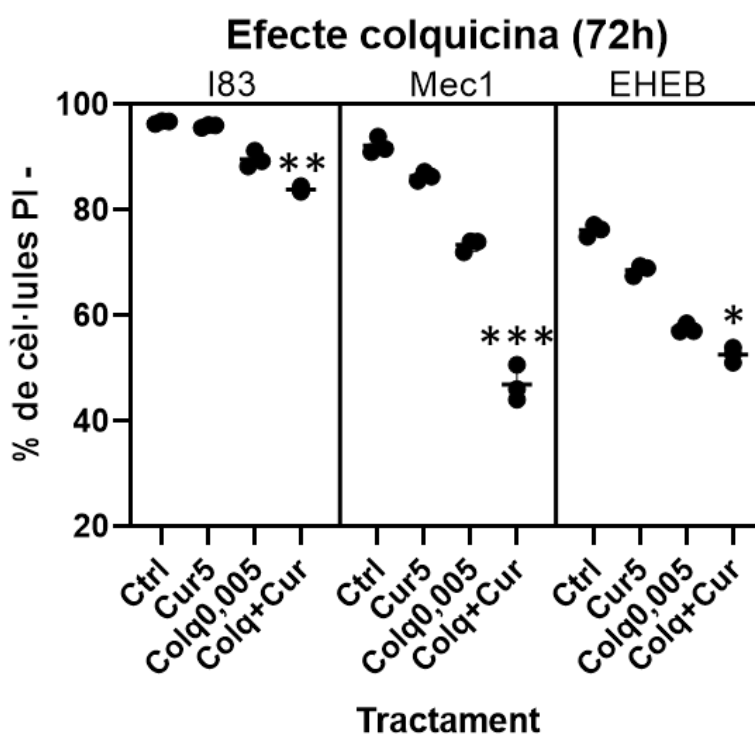


Figura 34: Efecte de la colquicina a les 72 hores d'incubació sobre la integritat de la membrana cel·lular i efecte sinèrgic de la curcumina. La curcumina va tenir un efecte potenciador de la colquicina significatiu en totes tres línies cel·lulars. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

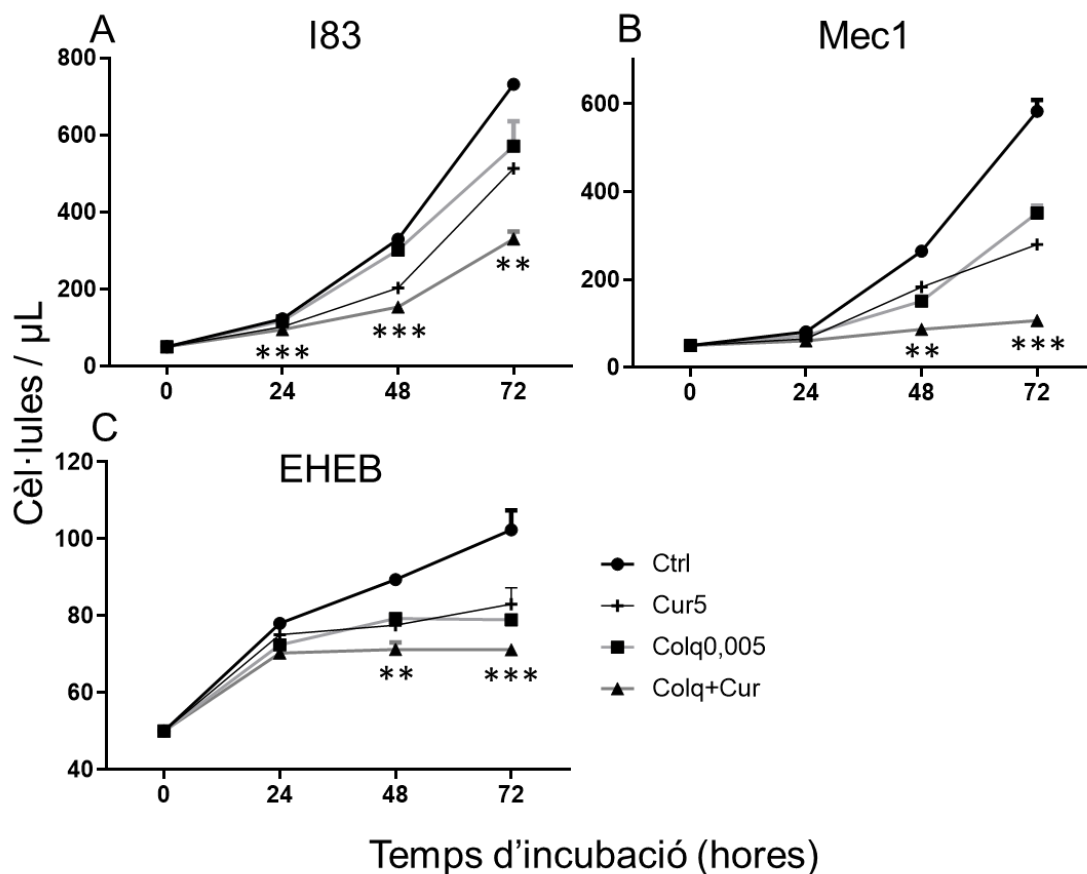


Figura 35: Efecte de la colquicina sola i en combinació amb la curcumina sobre la proliferació cel·lular. La colquicina va reduir la proliferació cel·lular i es va veure potenciada significativament per la curcumina en totes tres línies cel·lulars. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

La colquicina va produir un bloqueig sostingut i significatiu de les cèl·lules en les fases S i G2M en les I83 i les Mec1 (**Figura 36 A i B**). En canvi, en les EHEB va tenir l'efecte contrari, reduint de forma significativa el percentatge de cèl·lules en aquestes fases a les 24 hores (**Figura 36 C**). A temps d'incubació més llargs es va produir un lleuger increment del percentatge de cèl·lules en aquestes dues fases, tot i que no va resultar significatiu (**Figura 36 C**). Pel que fa a la combinació amb curcumina, la potenciació de l'efecte bloquejador no va resultar significativa en cap cas (**Figura 36 A, B i C**).

Avaluant cada fase del cicle cel·lular per separat, es va observar que el bloqueig induït per la colquicina es produïa significativament tant en fase S com en G2M (**Taula 7**). En les I83, el bloqueig va ser més important en fase S, mentre que en les Mec1 ho va ser més en fase G2M (**Taula 7**). En EHEB, a les 24 hores la colquicina va produir una disminució de cèl·lules en fase S, però a partir de les 48 hores s'observava un bloqueig significatiu de cèl·lules en aquesta fase (**Taula 7**). La combinació amb curcumina va tenir un efecte potenciador moderat, augmentant significativament el bloqueig en fase G2M en Mec1 (48 h) i en fase S en EHEB (72 h). En I83 va potenciar el bloqueig en fase S a les 24 hores, i posteriorment va reduir el nombre de cèl·lules en aquesta fase a les 48 hores (**Taula 7**).

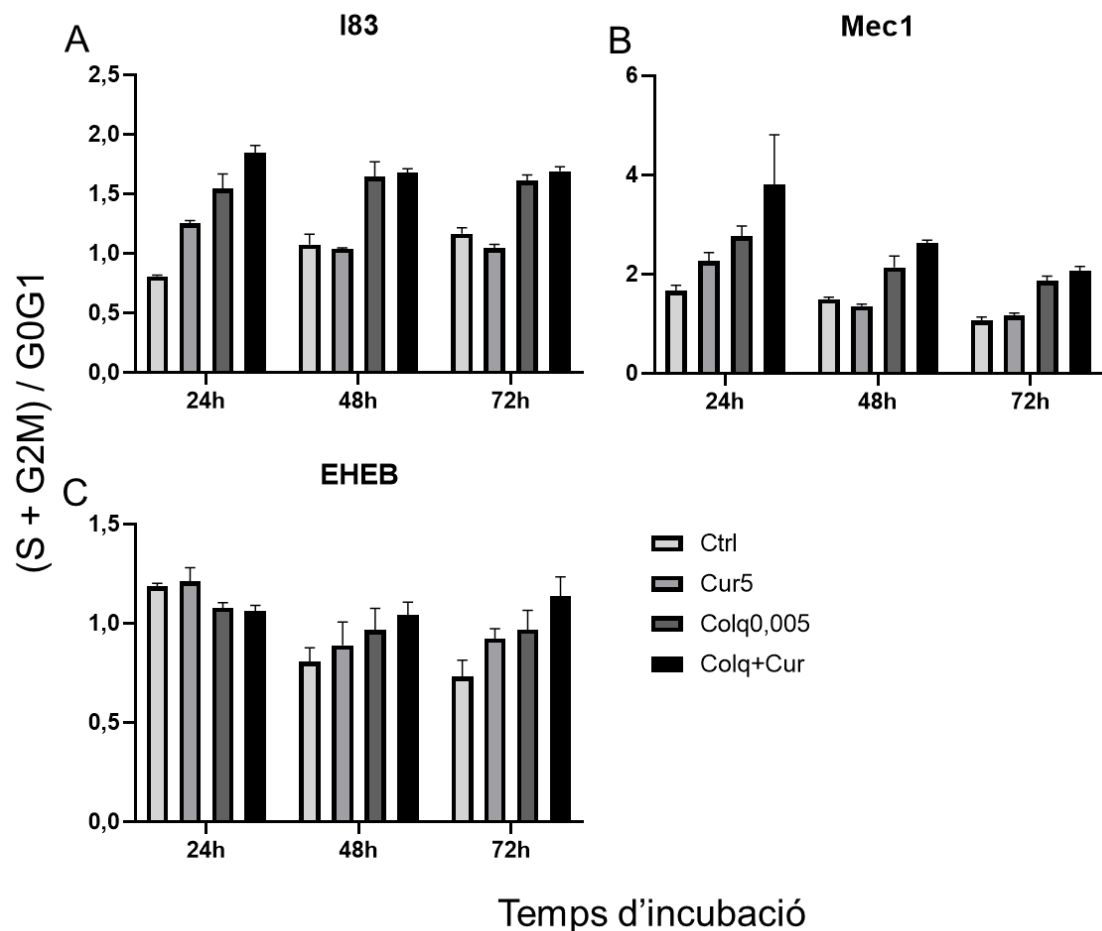


Figura 36: Efecte de la colquicina sola i en combinació amb la curcumina sobre la ràtio (S + G2M) / G0G1. La colquicina va produir un increment de la ràtio en I83 i Mec1. La combinació amb la curcumina no va produir canvis significatius en aquest efecte. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula 7: Efecte de la colquicina sola o en combinació amb curcumina sobre les fases S i G2M.

| Colquicina | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|-------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| 24h | +++ | ++ | / | ++ | - | / |
| 48h | +++ | / | / | ++ | + | / |
| 72h | + | + | + | +++ | + | / |
| +Cur | | | | | | |
| 24h | ++ | / | / | / | / | / |
| 48h | -- | / | / | + | / | / |
| 72h | / | / | / | / | + | / |

S'indica si es va produir un increment del percentatge de cèl·lules (+) o una disminució (-), respecte al control, en el cas de la colquicina; i respecte a la colquicina sola, en el cas de la colquicina combinada amb curcumina. / $P > 0,05$; + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$.

Pel que fa a la citomorfologia, la colquicina va induir importants alteracions citomorfològiques en les I83 i les Mec1, ja a les 24 hores, produint unes imatges del nucli molt característiques, amb compactació de la cromatina i una aparent fragmentació (**Figura 37 A i C**). La combinació amb curcumina va incrementar les alteracions citomorfològiques, específicament relacionades amb la compactació de la cromatina nuclear i sobre el nombre de cèl·lules afectades (**Figura 37 B i D**). En la línia EHEB, l'efecte va ser diferent, amb fragmentació de nucli però també amb producció de vacúols en el citoplasma i aparició de cèl·lules amb deformacions de nucli, polinucleades o amb altres aberracions (**Figura 37 E**). Amb la combinació amb curcumina es van observar els mateixos efectes que en la seva absència (**Figura 37 F**).

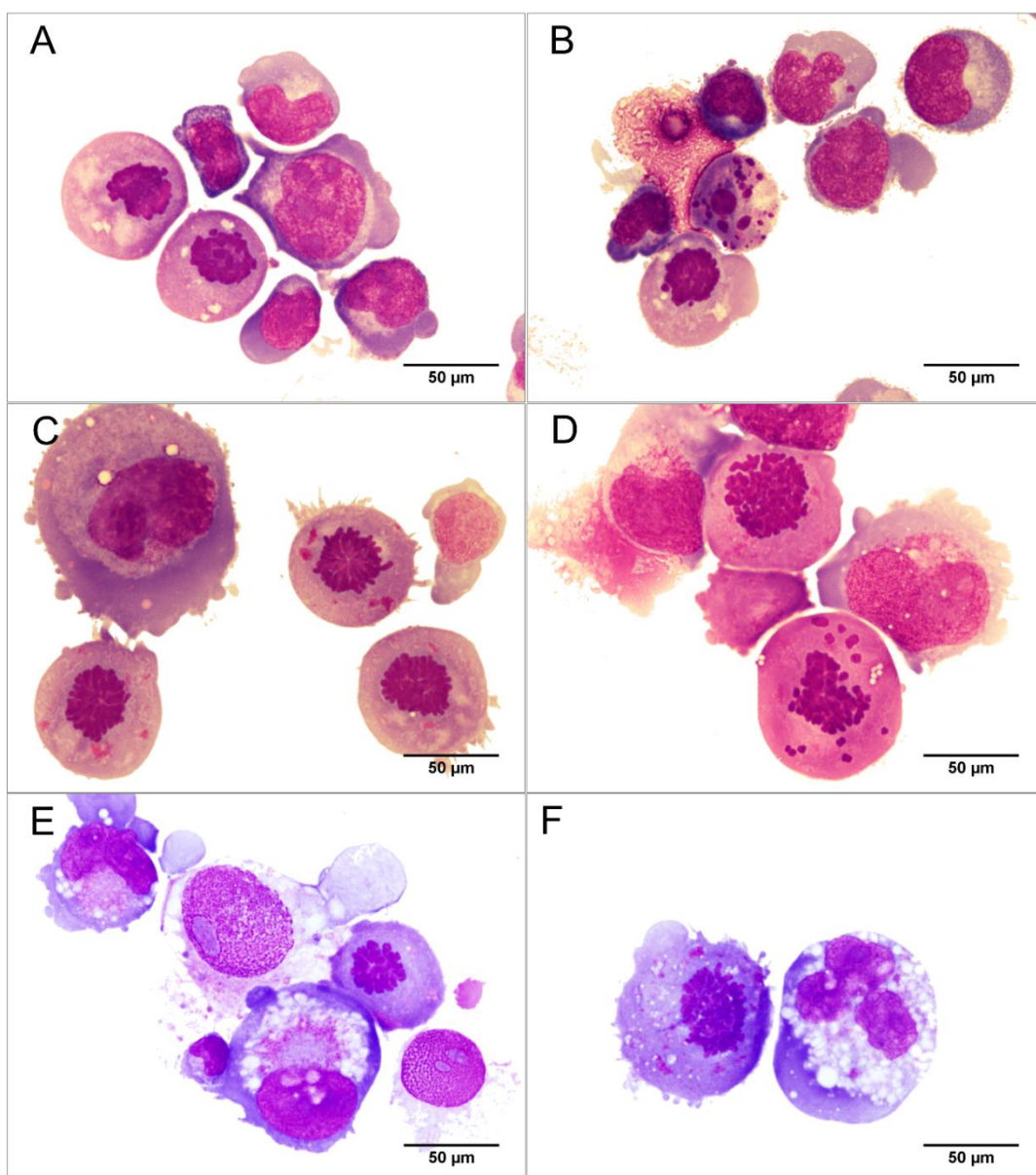


Figura 37: Efectes de la colquicina 0,005 µM sobre la citomorfologia (100X). A Colquicina I83 72 h; B Colquicina + Curcumina I83 72 h; C Colquicina Mec1 72 h; D Colquicina + Curcumina Mec1 72 h; E Colquicina EHEB 72 h; F Colquicina + Curcumina EHEB 72 h.

2.5. Citarabina

El tractament amb citarabina 0,01 μM va produir un efecte lleu sobre la disrupció de la membrana cel·lular, que no va resultar significatiu. La combinació amb la curcumina no va generar cap efecte. Només en el cas de les I83 va produir un lleuger increment de la citotoxicitat que va resultar significatiu (**Figura 38**). Aquest efecte combinatori va ser additiu (CDI = 1).

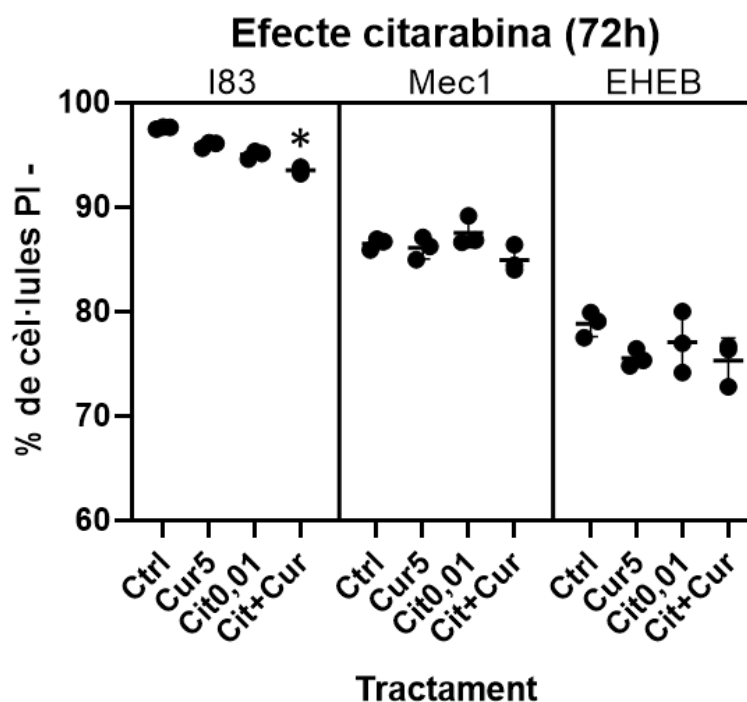


Figura 38: Efecte de la citarabina a les 72 hores d'incubació sobre la integritat de la membrana cel·lular i efecte sinèrgic de la curcumina. La curcumina va tenir un lleuger efecte potenciador de la citarabina, significatiu respecte al fàrmac tot sol, només en les I83. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Aquesta mateixa dosi de citarabina sí que va tenir un efecte notable i significatiu bloquejant la proliferació cel·lular en les I83 i les Mec1 (**Figura 39 A i B**), i en menor mesura, en les EHEB (**Figura 39 C**). La combinació amb la curcumina va incrementar significativament aquest bloqueig en les tres línies, tot i que l'efecte més notable va ser en Mec1 (**Figura 39 B**), en què va reduir la concentració cel·lular final, a les 72 hores, de 400 a 300 cèl·lules/ μL . En les I83 i les EHEB es va observar un efecte potenciador significatiu de la curcumina només a les 48 hores (**Figura 39 A i C**).

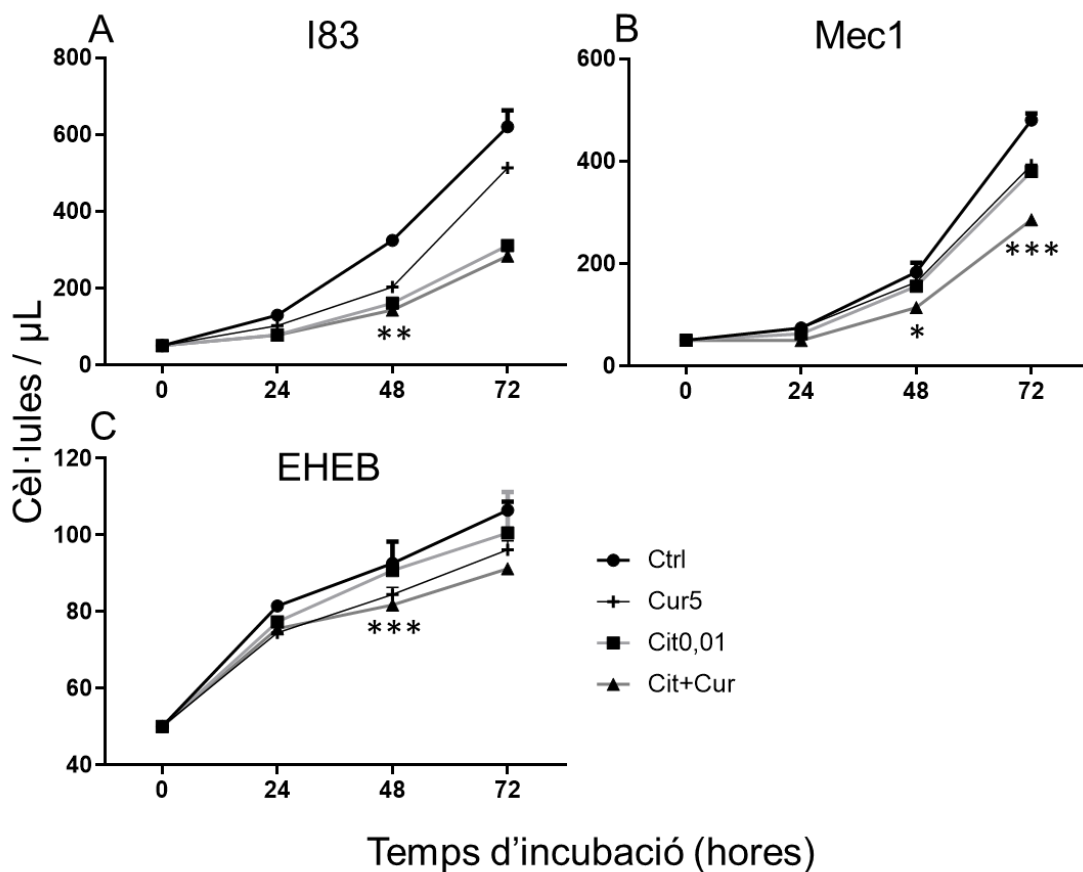


Figura 39: Efecte de la citarabina sola i en combinació amb la curcumina sobre la proliferació cel·lular. La citarabina va reduir la proliferació en totes tres línies cel·lulars, i es va veure potenciada significativament per la curcumina, especialment en les Mec1. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa al cicle cel·lular, la citarabina va produir un bloqueig significatiu de les cèl·lules en les fases S i G2M a les 24 hores en les I83 i les Mec1 (**Figura 40 A i B**). Aquest efecte s'anava atenuant, deixant de ser significatiu a les 48 hores en Mec1 i a les 72 hores en I83. Pel que fa a les EHEB, no es va observar cap efecte (**Figura 40 C**). La combinació amb la curcumina només va tenir un efecte significatiu en les I83 a les 48 hores, reduint parcialment el percentatge de cèl·lules bloquejades per la citarabina en les fases S i G2M (**Figura 40 A**). Aquest efecte també es va produir a les 24 hores, sense resultar significatiu.

Avaluant cada fase del cicle cel·lular per separat es va observar que la citarabina va produir un bloqueig significatiu en fase S, en les I83 a les 24 i 48 hores ($P < 0,0005$) i en les Mec1 a les 24 i 72 hores ($P < 0,005$). En I83, la citarabina també va produir un bloqueig parcial en G2M ($P < 0,05$) (**Taula 8**). En les EHEB no hi va haver efecte (a excepció d'una lleu disminució significativa en G2M a les 48 hores). La combinació amb curcumina va potenciar significativament el bloqueig en fase S en les I83 i les Mec1 i va reduir el percentatge de cèl·lules bloquejades en G2M (**Taula 8**).

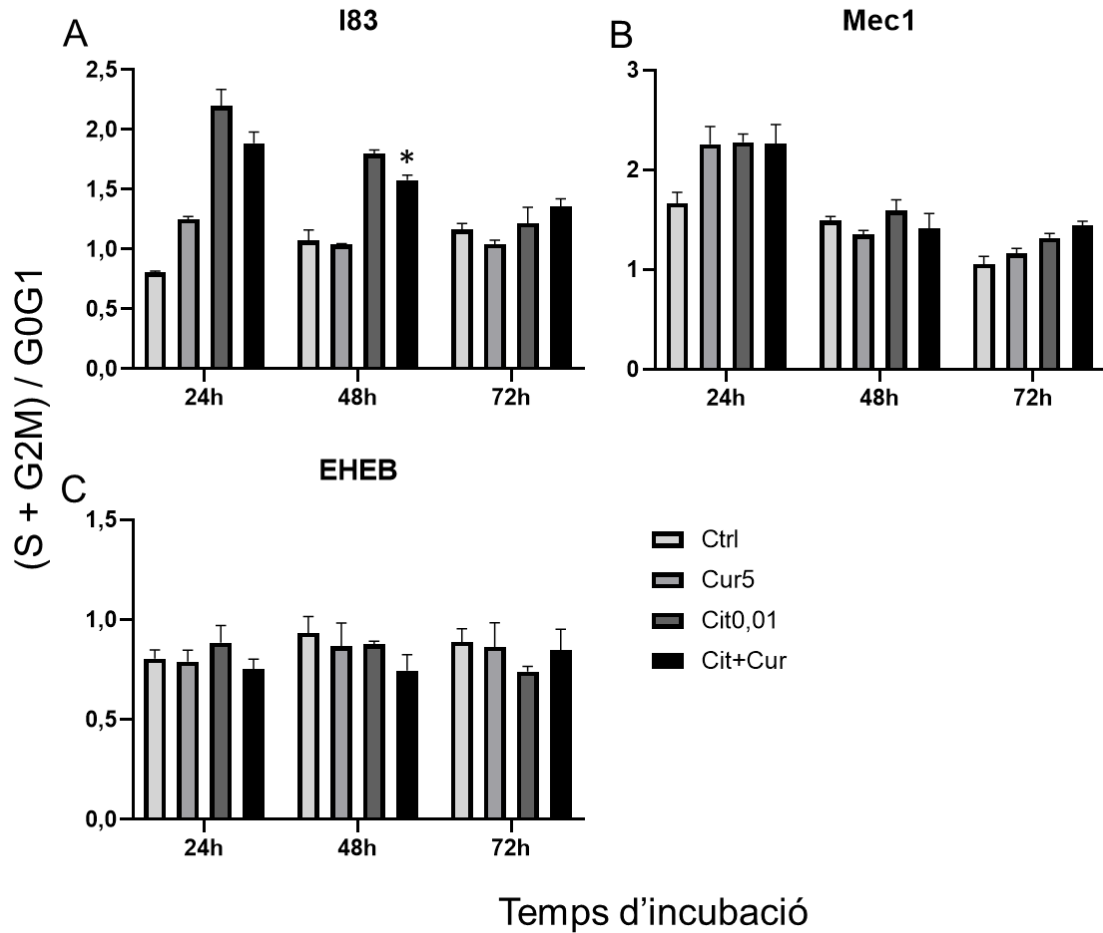


Figura 40: Efecte de la citarabina sola i en combinació amb la curcumina sobre la ràtio (S + G2M) / G0G1. La citarabina va produir un increment significatiu de la ràtio en les I83 i les Mec1. La curcumina va reduir lleugerament però de forma significativa aquest efecte en les I83, mentre que en les Mec1 no va produir canvis significatius. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula 8: Efecte de la citarabina sola o en combinació amb curcumina sobre les fases S i G2M.

| Citarabina | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|-------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| 24h | +++ | + | ++ | / | / | / |
| 48h | +++ | + | / | / | / | - |
| 72h | / | + | ++ | / | / | / |
| +Cur | | | | | | |
| 24h | / | - | ++ | - | / | - |
| 48h | + | -- | - | / | / | / |
| 72h | / | / | +++ | - | / | / |

S'indica si es va produir un increment del percentatge de cèl·lules (+) o una disminució (-), respecte al control, en el cas de la citarabina; i respecte a la citarabina sola, en el cas de la citarabina combinada amb curcumina. / $P > 0,05$; + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$.

Pel que fa a la citomorfologia, en les I83, amb el tractament amb citarabina es van observar cèl·lules amb un augment considerable de mida i amb nuclis lobulats o polinucleades (**Figura 41 A**). Amb la combinació amb la curcumina es van mantenir els mateixos efectes (**Figura 41 B**).

En les Mec1, es va produir una alteració de la cromatina nuclear semblant a la que produïa la colquicina, amb compactació i aparent fragmentació. També es va observar una certa vacuolització, amb vacúols relativament petits (**Figura 41 C**). L'efecte citotòxic començava a ser evident a les 48 hores, i a les 72 hores semblava disminuir. Amb la combinació amb curcumina es va observar la mateixa alteració de la cromatina (**Figura 41 D**), i a més, l'efecte es va anticipar i van incrementar les alteracions citomorfològiques.

En EHEB, la citarabina no va produir efectes evidents, només s'observava puntualment alguna cèl·lula aberrant, amb vacúols d'autofàgia (**Figura 41 E**) o algun cos apoptòtic. Amb la curcumina es va mantenir l'efecte, amb un lleuger increment de les alteracions (**Figura 41 F**).

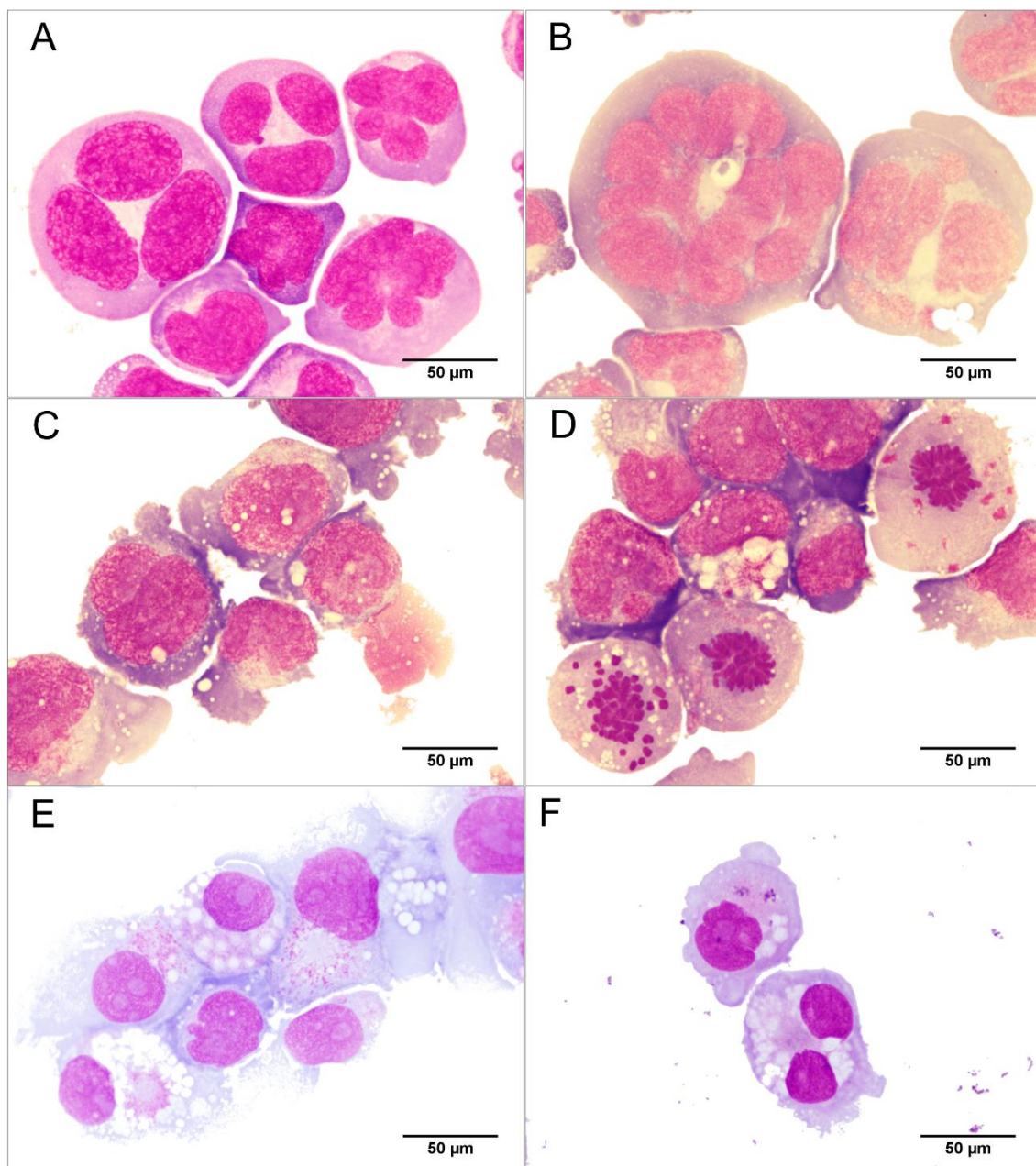


Figura 41: Efectes de la citarabina 0,01 μM sobre la citomorfologia (100X). A Citarabina I83 48 h; B Citarabina + Curcumina I83 72 h; C Citarabina Mec1 24 h; D Citarabina + Curcumina Mec1 24 h; E Citarabina EHEB 48 h; F Citarabina + Curcumina EHEB 48 h.

2.6. Fludarabina

El tractament amb fludarabina 10 μM va tenir un important i significatiu efecte disruptor de la membrana cel·lular en les I83 (increment de l'afectació superior al 10%). En canvi, en les Mec1 i les EHEB no va tenir efecte (**Figura 42**). Val la pena remarcar que les Mec1 estan descrites com a cèl·lules resistents a la fludarabina, a causa d'una mutació en *TP53*. La combinació amb curcumina va potenciar significativament l'efecte produït en les Mec1, un efecte que va ser

additiu (CDI = 0,95). També va potenciar significativament l'efecte produït sobre les EHEB, també de forma additiva (CDI = 0,98), no així el produït sobre les I83, la línia que s'havia mostrat més susceptible al tractament únicament amb fludarabina (**Figura 42**).

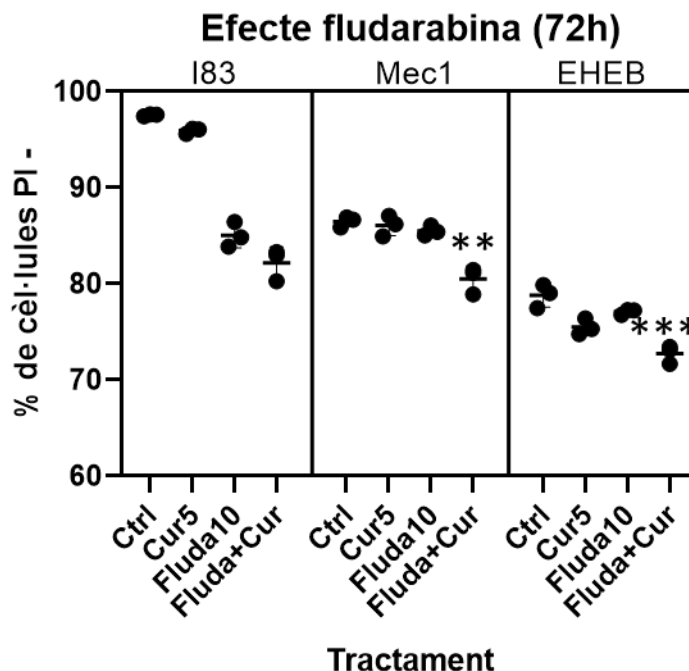


Figura 42: Efecte de la fludarabina a les 72 hores d'incubació sobre la integritat de la membrana cel·lular i efecte sinèrgic de la curcumina. La curcumina va tenir un efecte potenciador de la fludarabina significatiu respecte al fàrmac tot sol en Mec1 i EHEB. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa a la proliferació cel·lular, la fludarabina va tenir un efecte bloquejant potent tant en les I83 com en les Mec1 (**Figura 43 A i B**). En canvi, va tenir un efecte molt moderat en les EHEB (**Figura 43 C**). La combinació amb curcumina va potenciar significativament el bloqueig en totes tres línies, però de forma més notable en les Mec1 (**Figura 43 B**).

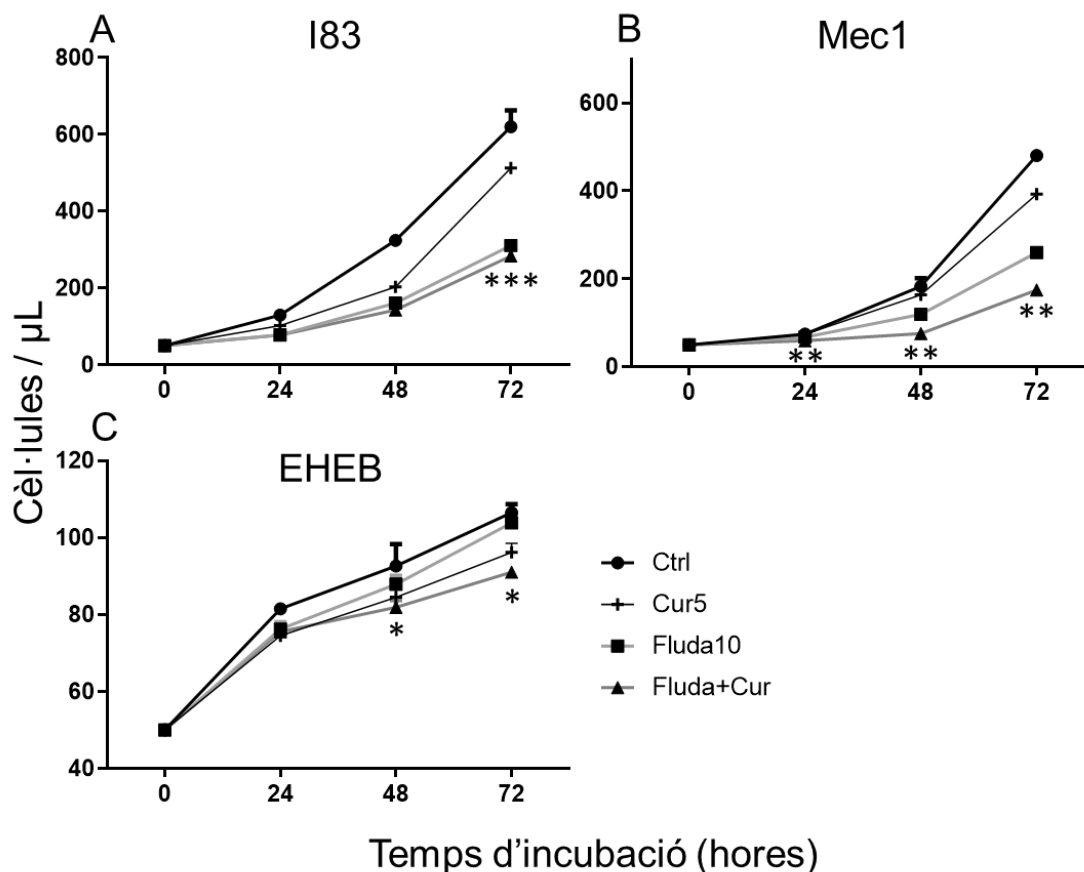


Figura 43: Efecte de la fludarabina sola i en combinació amb la curcumina sobre la proliferació cel·lular. La fludarabina va reduir la proliferació cel·lular en les I83 i les Mec1, i es va veure potenciada significativament per la curcumina en totes tres línies. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa al cicle cel·lular, la fludarabina 10 μM va produir diferents efectes. En les EHEB va produir una reducció de la ràtio (S + G2M) / G0G1, amb un efecte molt moderat i no significatiu (**Figura 44 C**). En les I83 no va tenir efecte a les 24 hores, mentre que a temps d'incubació superiors no va ser possible l'obtenció de dades perquè la disrupció del cicle cel·lular va ser total (**Figura 44 A**). Pel que fa a les Mec1, la fludarabina no va tenir cap efecte significatiu fins a les 72 hores, quan va produir un lleuger increment de la ràtio (**Figura 44 B**). En general, la combinació amb curcumina no va produir cap efecte, només en les I83 a les 24 hores, amb un lleuger increment de la ràtio (**Figura 44 A**).

Analitzant les fases del cicle cel·lular per separat, sobre les I83 es va observar que la fludarabina produïa un bloqueig important en la fase S a les 24 hores. A causa de la disminució associada del percentatge de cèl·lules en fase G2M, aquest efecte no tenia cap impacte sobre la ràtio (S + G2M) / G0G1. La combinació amb la curcumina va potenciar encara més l'efecte de la fludarabina (**Taula 9**). Pel que fa a les Mec1, l'efecte va ser similar, però més atenuat i sostingut fins a les 72 hores del tractament, ja que no es va produir una disrupció total del cicle com l'observada en les I83. La combinació amb curcumina va potenciar l'efecte a les 24 hores, incrementant el bloqueig en fase S (**Taula 9**). En les EHEB no es va observar cap efecte destacable, ni amb el tractament únicament amb fludarabina ni amb la combinació amb curcumina (**Taula 9**).

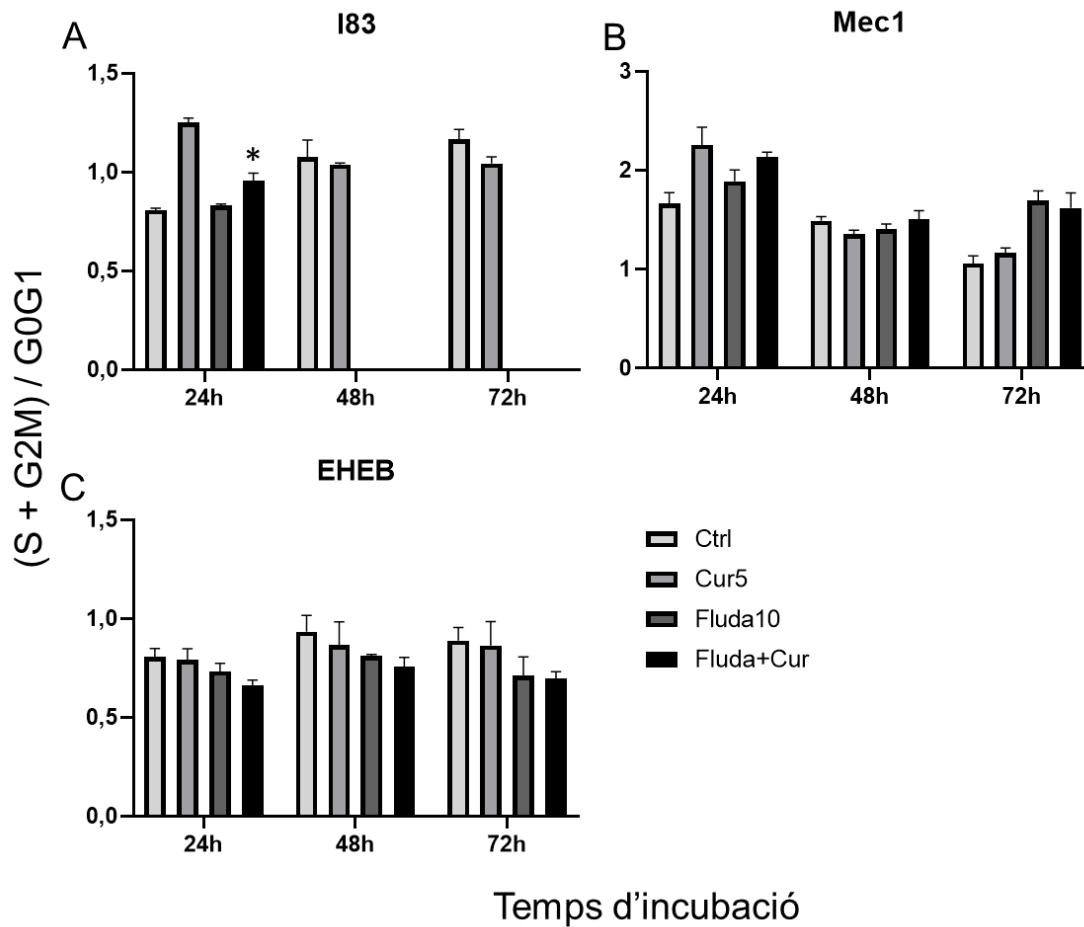


Figura 44: Efecte de la fludarabina sola i en combinació amb la curcumina sobre la ràtio (S + G2M / G0G1). La fludarabina va produir una forta disrupció del cicle cel·lular en I83, mentre que en Mec1 va produir un increment de la ràtio a les 72 hores. La combinació amb la curcumina només va produir un efecte significatiu en I83 a les 24 hores, produint un increment de la ràtio. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula 9: Efecte de la fludarabina sola o en combinació amb curcumina sobre les fases S i G2M.

| Fludarabina | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|-------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| 24h | +++ | -- | + | - | / | / |
| 48h | // | // | / | / | / | - |
| 72h | // | // | +++ | / | / | / |
| +Cur | | | | | | |
| 24h | ++ | - | ++ | -- | / | / |
| 48h | // | // | / | + | / | / |
| 72h | // | // | / | - | / | / |

S'indica si es va produir un increment del percentatge de cèl·lules (+) o una disminució (-), respecte al control, en el cas de la fludarabina; i respecte a la fludarabina sola, en el cas de la fludarabina combinada amb curcumina. / $P > 0,05$; + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$. En les I83, a les 48 i 72 hores no es van poder obtenir resultats (//).

Pel que fa a la citomorfologia, la fludarabina va produir la formació de vesícules al citoplasma a les 24 hores en les I83, efecte que va incrementar a temps d'incubació superiors i al qual es van sumar altres efectes com la formació d'irregularitats en el nucli i la membrana cel·lular i la presència de cèl·lules polinucleades. A més, els nuclis presentaven uns nuclèols molt marcats, i en algun cas, un empaquetament molt característic de la cromatina nuclear (**Figura 45 A**). La combinació amb la curcumina no va produir cap efecte citomorfològic evident (**Figura 45 B**).

En les Mec1, la fludarabina va induir irregularitats en la membrana cel·lular i la presència d'algunes cèl·lules amb nuclis aberrants i polinucleats a les 24 hores. La combinació amb curcumina va permetre observar la fragmentació d'alguns nuclis a les 24 hores (**Figura 45 D**), efecte que amb el tractament únicament amb fludarabina no va ser evident fins a les 48 hores (**Figura 45 C**). A les 48 hores, en canvi, amb el tractament amb fludarabina i curcumina s'observaven més cèl·lules amb característiques d'apoptosi que en el tractament únicament amb fludarabina. A les 72 hores no es van observar diferències entre els dos tractaments.

Finalment, en les EHEB, la fludarabina va produir una afectació important, amb presència d'algunes cèl·lules més grans, amb alteracions nuclears i polinucleació i amb vacúols citoplasmàtics a les 24 hores (**Figura 45 E**). A partir de les 48 hores es començaven a observar cèl·lules amb característiques pròpies de mort cel·lular. La combinació amb la curcumina no va produir cap efecte citomorfològic addicional (**Figura 45 F**).

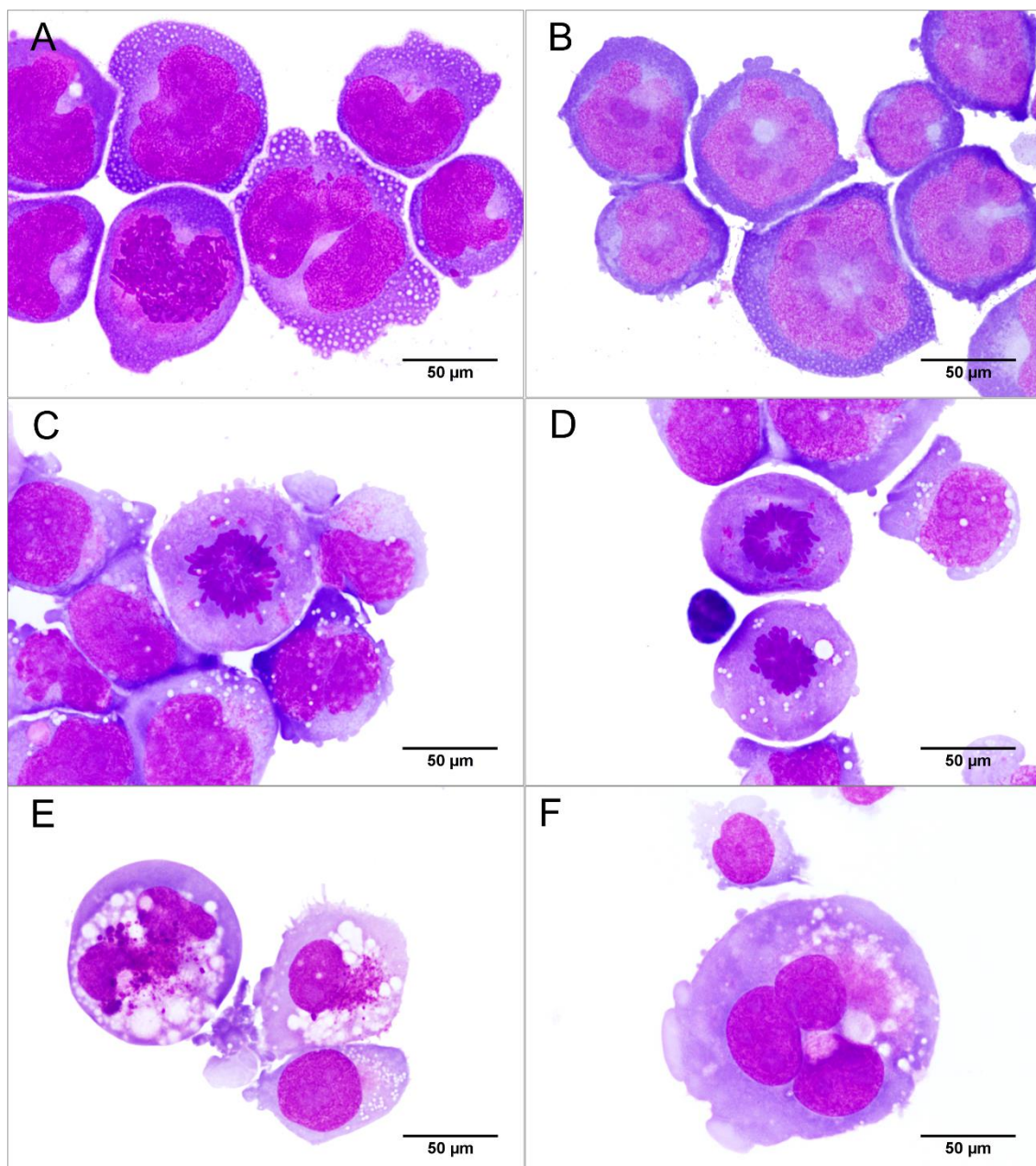


Figura 45: Efectes de la fludarabina 10 µM sobre la citomorfologia (100X). A Fludarabina I83 48 h; B Fludarabina + Curcumina I83 72 h; C Fludarabina Mec1 48 h; D Fludarabina + Curcumina Mec1 24 h; E Fludarabina EHEB 24 h; F Fludarabina + Curcumina EHEB 24 h.

Per facilitar la lectura conjunta de tots els resultats obtinguts en aquest apartat, aquests es mostren de forma resumida a la **Figura suplementària 1**, **Taula suplementària 5**, **Taula suplementària 6** i **Taula suplementària 7** de Material suplementari.

2.7. Ibrutinib i venetoclax

L'ibrutinib i el venetoclax es van testar en la línia I83 per realitzar un banc de concentracions per tal de decidir la dosi més adequada per utilitzar en cultius primaris. Els resultats d'aquest apartat corresponen al banc de proves de concentracions i l'estudi de la citotoxicitat realitzats sobre la línia cel·lular I83, a un únic temps d'incubació i en absència de triplicats, de manera que no ha estat possible calcular la significança dels resultats.

L'ibrutinib no va mostrar citotoxicitat a concentracions inferiors a 10 μM durant el període de temps de l'assaig. En combinació amb curcumina 5 μM , en canvi, va produir un potent efecte citotòxic (**Figura 46 A**). L'efecte va ser clarament sinèrgic, tant per la combinació amb l'ibrutinib 5 μM com 10 μM (CDI = 0,26 i 0,16 respectivament). Pel que fa a la proliferació cel·lular, l'ibrutinib va produir un bloqueig relativament important ja a la concentració 5 μM . La curcumina va produir un bloqueig molt potent per sí sola, i va incrementar encara més el que produïa l'ibrutinib (**Figura 46 B**).

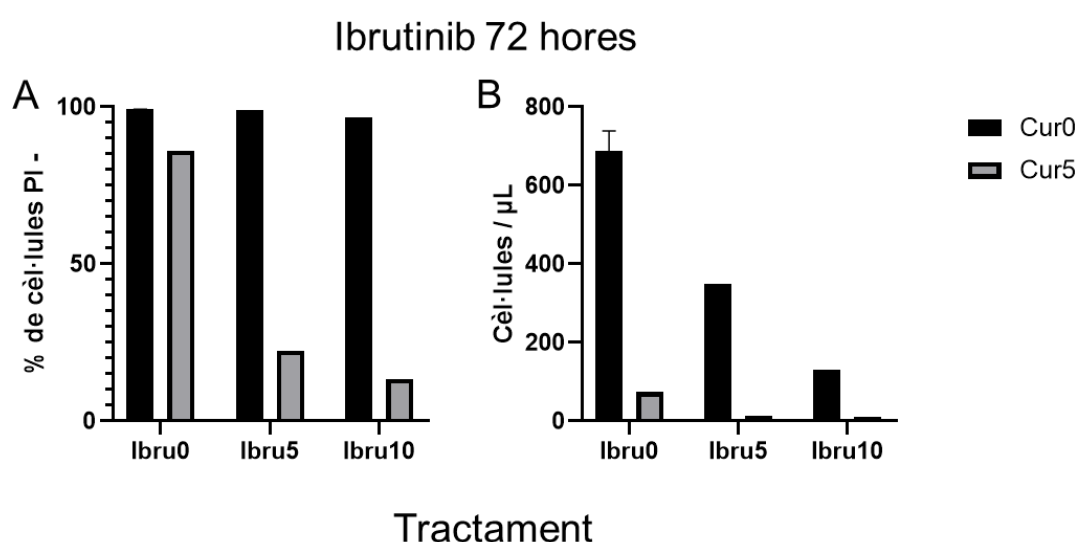


Figura 46: Efecte de l'ibrutinib i de la seva combinació amb curcumina 5 μM sobre la línia I83 a les 72 hores d'incubació. A Efecte sobre la integritat de la membrana; B Efecte sobre la proliferació cel·lular.

El venetoclax va començar a produir un efecte visible a una concentració 1 μM . A partir d'aquesta concentració, l'efecte va incrementar sobtadament, produint citotoxicitat (**Figura 47 A**) i un bloqueig quasi total de la proliferació cel·lular (**Figura 47 B**) a la concentració 5 μM . La combinació amb curcumina 5 μM va incrementar sinèrgicament la citotoxicitat del venetoclax (**Figura 47 A**), produint un CDI de 0,92, de 0,33 i de 0,27 pel venetoclax 1, 5 i 7,4 μM respectivament. Pel que fa a la proliferació cel·lular, la curcumina va produir un bloqueig relativament potent, però en combinació amb el venetoclax no es va observar un efecte major que el que produïen aquests dos compostos per separat (**Figura 47 B**).

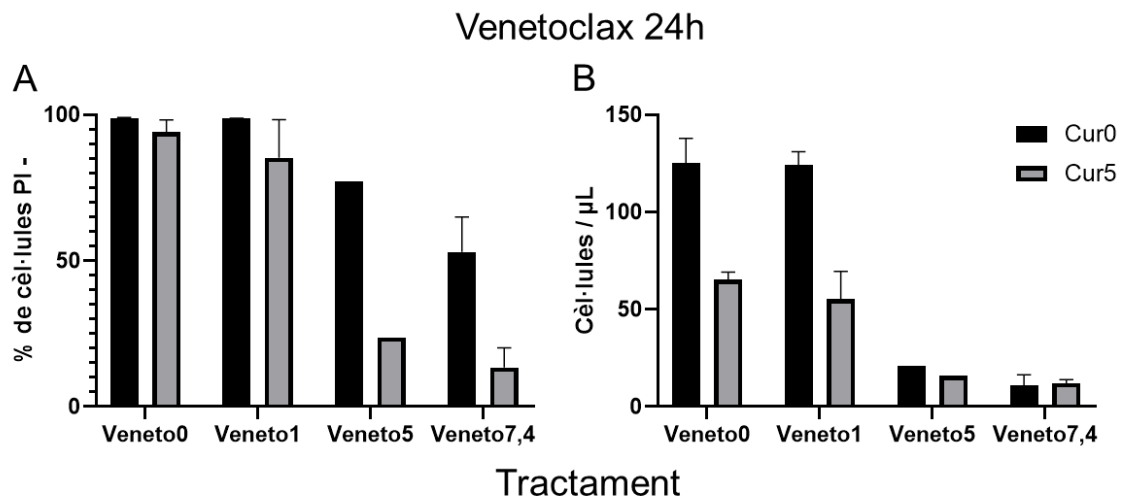


Figura 47: Efecte del venetoclax i de la seva combinació amb curcumina 5 μM sobre la línia I83 a les 24 hores d'incubació. A Efecte sobre la integritat de la membrana; B Efecte sobre la proliferació cel·lular.

3. Efectes de la curcumina sobre la producció de ROS

Com s'ha explicat prèviament a *Material i mètodes*, per a la detecció de ROS es van utilitzar diferents agents estimuladors i marcatges amb sondes fluorescents. Com a estimulador per al control positiu, es va començar utilitzant el PMA, sense que generés cap efecte observable sobre la producció de ROS en les cèl·lules estudiades, de manera que es va descartar del disseny experimental. El TBHP, un compost prooxidant utilitzat com a control positiu en la producció d'espècies reactives de l'oxigen, sí que va produir un efecte clar induint la generació de ROS en els models estudiats, de manera que es va seleccionar com a control positiu, a una concentració final de 200 µM.

Els experiments inicials van començar amb la utilització de DHR. La combinació amb curcumina va evidenciar problemes pel solapament dels espectres d'emissió de les dues molècules. Per aquest motiu, finalment es va utilitzar el reactiu CellROX Deep Red per detectar la producció d'espècies reactives de l'oxigen en les mostres subjecte d'estudi, atès que el seu espectre d'emissió de fluorescència es troba en el roig llunyà (665 nm) i no produeix cap solapament amb l'espectre d'emissió de la curcumina.

Per comprovar si la curcumina tenia algun efecte sobre el metabolisme de ROS, es van realitzar diferents proves sobre les tres línies cel·lulars, incubant a diferents temps i amb diferents concentracions de curcumina. Per tal d'avaluar l'efecte de les diferents concentracions de curcumina sobre la producció de ROS, es va utilitzar la Intensitat Relativa de Fluorescència (IRF). L'IRF es va calcular a partir de les Mitjanes d'Intensitat de Fluorescència (MIF) corresponents a CellROX, tal com s'indica a continuació:

$$IRF = \frac{MIF (\text{Concentració testada}) - MIF (\text{DMSO})}{MIF (\text{DMSO})} \times 100$$

A causa que l'emissió de fluorescència no va presentar una distribució normal en tots els casos, en aquest apartat, les MIF corresponen a medianes en comptes de mitjanes.

La curcumina va incrementar lleugerament la producció de ROS de forma dosi-dependent (**Figura 48** i **Taula 10**). A la dosi 10 µM de curcumina s'observava un pic de cèl·lules amb menor producció de ROS (**Figura 48**), que correspondria a cèl·lules que han iniciat una reducció del metabolisme a causa d'un inici de citotoxicitat (**Figura 49**). El major efecte en la producció de ROS es va observar a les 24 hores, temps al qual corresponen els resultats exposats. A temps més curts no es va observar efecte, mentre que a temps majors, l'efecte disminuïa. El major increment en la producció de ROS generat per la curcumina es va produir en les I83, mentre que les EHEB van ser la línia que va presentar una menor resposta.

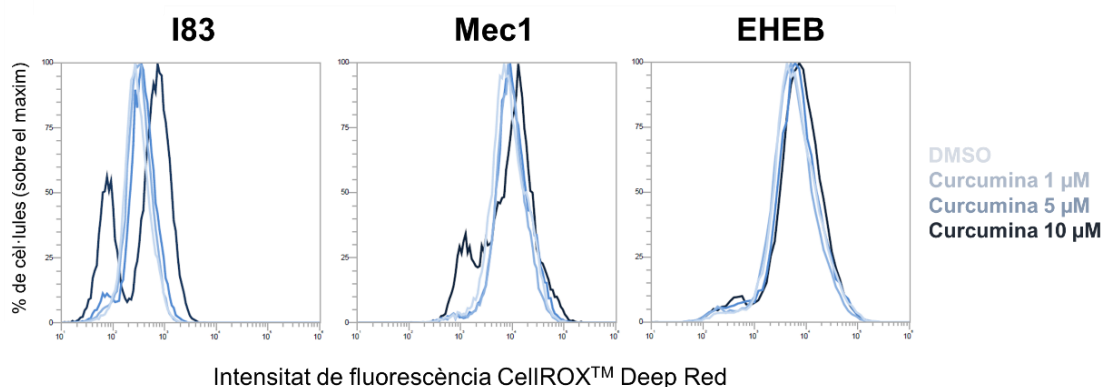


Figura 48: Efecte de la curcumina (0, 1, 5 i 10 μM) sobre la producció de ROS a les 24 hores d'incubació en I83, Mec1 i EHEB. El desplaçament cap a la dreta de les corbes d'intensitat de fluorescència a dosis creixents indica que la curcumina va produir un increment en els nivells de ROS de les cèl·lules.

Taula 10: Efecte de la curcumina sobre ROS.

| | I83 (24h) | | Mec1 (24h) | | EHEB (24h) | |
|-----------|--------------|--------|----------------|--------|----------------|-------|
| | MIF | IRF | MIF | IRF | MIF | IRF |
| DMSO | 286 ± 137,88 | 0 | 8155 ± 5523,43 | 0 | 5815 ± 4705,77 | 0 |
| Cur 1 μM | 319 ± 152,71 | 11,54 | 8993 ± 5275,09 | 10,28 | 5289 ± 4223,93 | -9,05 |
| Cur 5 μM | 378 ± 186,81 | 32,17 | 9692 ± 6207,65 | 18,85 | 6466 ± 5249,15 | 11,20 |
| Cur 10 μM | 714 ± 391,41 | 149,65 | 9904 ± 9638,38 | 21,45 | 7309 ± 6017,13 | 25,69 |
| TBHP | 86 ± 20,76 | -60,84 | 6835 ± 7900,78 | -16,19 | 8034 ± 6993,42 | 38,16 |

La curcumina va augmentar la producció de ROS de forma dependent de dosi. La reducció de ROS produïda per TBHP en I83 i Mec1 va ser causada per la disminució del metabolisme, a causa de l'entrada en apoptosi que va produir aquest compost a les 24 h. En aquest apartat, les MIF corresponen a medianes.

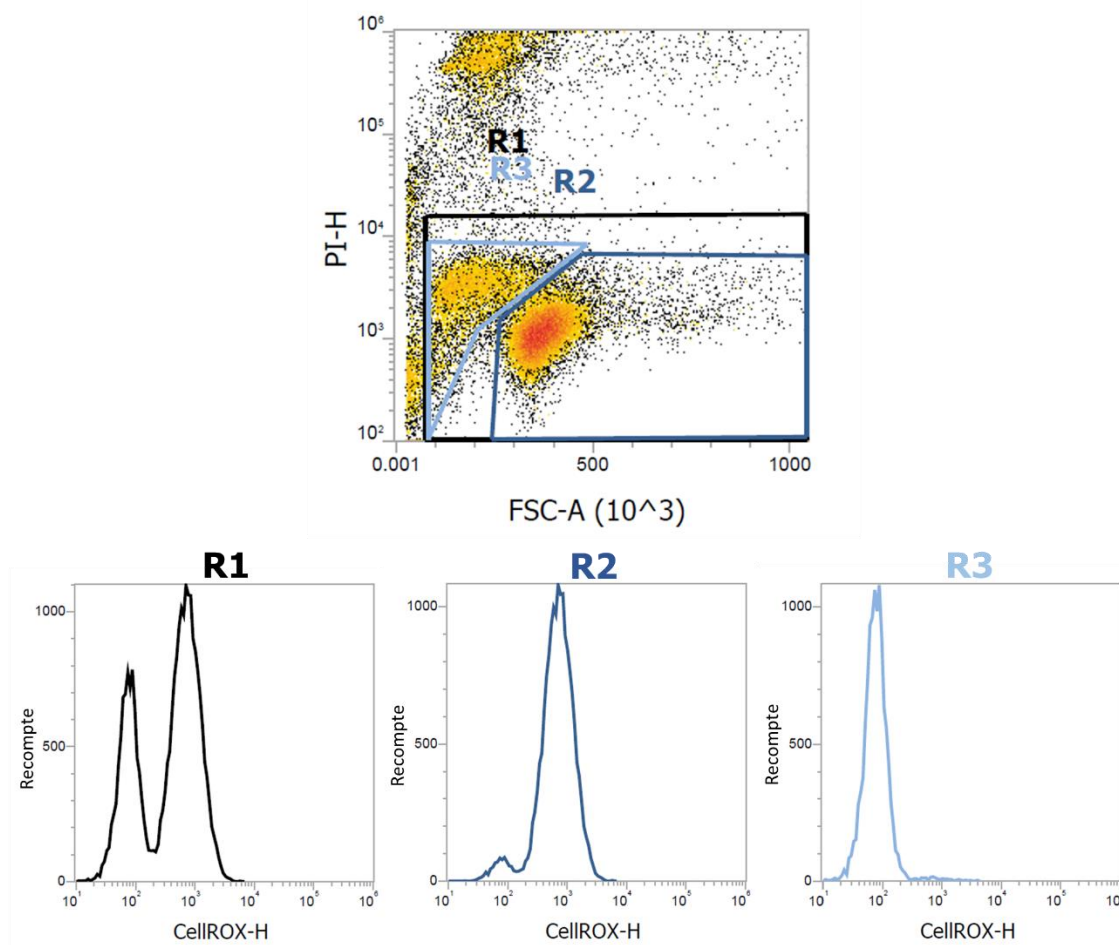


Figura 49: Relació entre la reducció de la producció de ROS induïda per la curcumina 10 μ M i la pèrdua d'integritat de membrana i mida cel·lular. R1, totalitat de les cèl·lules; R2, cèl·lules amb la integritat de la membrana conservada; R3, cèl·lules amb pèrdua de volum i integritat de la membrana cel·lular. En aquest gràfic es pot observar com l'aparició del segon pic de cèl·lules més a l'esquerra, amb una producció de ROS reduïda, que s'observava amb el tractament amb curcumina 10 μ M, està relacionat amb una pèrdua de la integritat de la membrana de les mateixes (R3), que es pot associar a un efecte citotòxic de la curcumina. Les imatges corresponen a la línia I83, que va presentar la major susceptibilitat a aquest efecte entre els models cel·lulars estudiats..

En aquest apartat també es va avaluar l'efecte de la curcumina en combinació amb el TBHP. La curcumina va tenir un efecte antioxidant i protector contra l'oxidació produïda per aquest compost. El TBHP va produir una potent oxidació als 30 minuts, que es va veure lleugerament atenuada amb la combinació amb curcumina. A temps d'incubació més llargs, l'oxidació generada pel TBHP produïa mort cel·lular de forma generalitzada, però la combinació amb la curcumina permetia la supervivència d'una petita fracció de cèl·lules (**Figura 50**, R:11). La concentració de curcumina que exercia un efecte protector més potent va variar en funció de la línia cel·lular. En les I83, la dosi menor, 1 μ M, va ser la que produïa un efecte protector més notable, que s'anava perdent a dosis creixents, mentre que en les Mec1 l'efecte protector augmentava a dosis majors. En les EHEB, la línia que va mostrar menys susceptibilitat a la citotoxicitat produïda pel TBHP, només la concentració de curcumina més baixa, 1 μ M, va exercir un lleuger efecte protector (**Figura 50**).

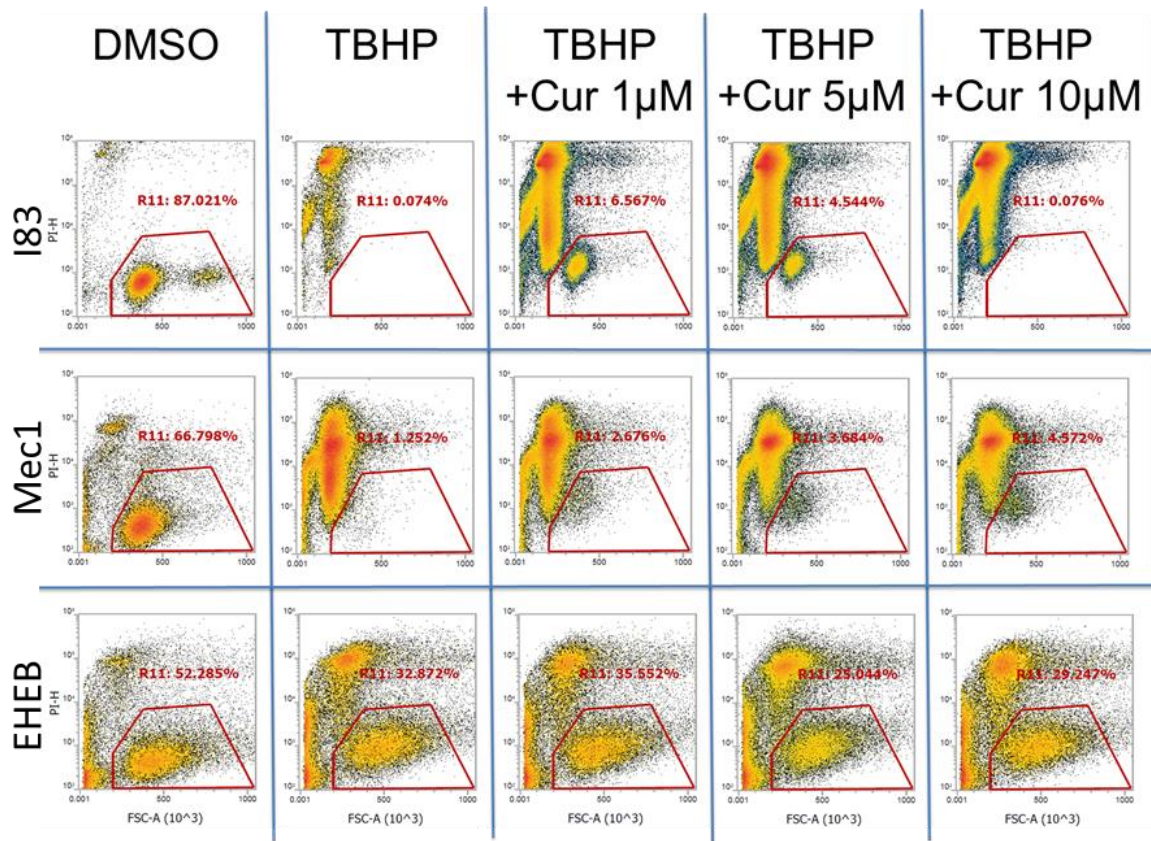


Figura 50: Efecte protector de la curcumina enfront de la citotoxicitat produïda per TBHP. La curcumina va reduir la citotoxicitat produïda per TBHP en models cel·lulars de LLC, com mostren els percentatges de cèl·lules negatives per PI (R11).

4. Extrusió de fàrmacs

Les primeres anàlisis d'extrusió de fàrmacs, realitzades amb diferents compostos com a substrat i I1 com a inhibidor, van mostrar que les I83 i les Mec1 tenien capacitat d'extrusió. Totes dues línies extrudien la Doxorubicina (Doxo). En canvi, cap de les dues extrudia el Hoechst 33342 (Ho342). Pel que fa a la Rodamina 123 (Rho123), era extrudida per les Mec1, però no per les I83. En canvi, la Mitoxantrona (MTX) era extrudida per les I83, però no per les Mec1 (**Taula 11 A** i **Figura 51**). L'única diferència que es va observar entre les I83 i la subpoblació diploide d'aquestes, va ser que les cèl·lules diploides no extrudien MTX (**Taula 11 A** i **Figura 51**).

Posteriorment, es va analitzar l'efecte que podia produir la curcumina sobre l'extrusió de fàrmacs de les cèl·lules. Per a això, es va substituir l'inhibidor I1 per curcumina a una concentració de 5 µM, i es va realitzar el mateix assaig utilitzant MTX com a substrat. Es va seleccionar aquest substrat perquè és l'únic que no presenta un solapament del seu espectre d'emissió amb el de la curcumina, i per tant, no presenta cap problema a l'hora de realitzar una anàlisi per citometria de flux. En aquest cas, es va analitzar també l'efecte sobre la línia EHEB. Es va observar que la curcumina produïa una reducció de l'extrusió de MTX en totes tres línies cel·lulars (**Taula 11 B**).

Taula 11: Extrusió de substrats fluorescents en els models cel·lulars de LLC. A Efecte inhibidor de I1 sobre l'extrusió de Rho123, Ho342, Doxo i MTX. B Efecte inhibidor de la curcumina sobre l'extrusió de MTX.

A

| I1 | Rho123 | Ho342 | Doxo | MTX |
|------|--------|-------|------|-----|
| I83P | - | - | + | + |
| I83 | - | - | + | - |
| Mec1 | + | - | + | - |

B

| Curcumina | I83P | Mec1 | EHEB |
|-----------|------|------|------|
| MTX | + | + | + |

S'indica si la combinació amb l'inhibidor en qüestió va generar un augment de la fluorescència (+), mostrant per tant que les cèl·lules tenien capacitat d'extrusió (+) o no (-) dels substrats estudiats.

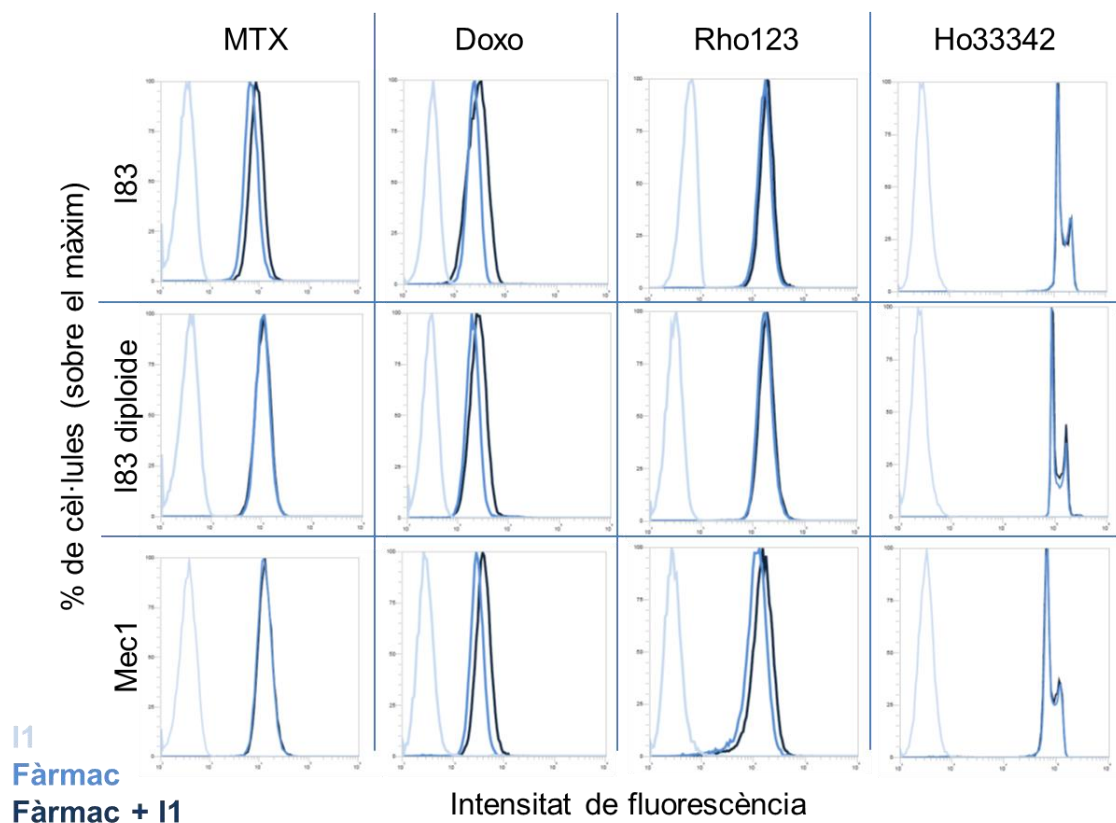


Figura 51: Extrusió i retenció de diferents compostos per part de les línies I83, I83 diploide i Mec1. L'increment de la intensitat de fluorescència produït amb l'ús de l'inhibidor I1 respecte a quan s'utilitza el fàrmac sol és indicatiu d'una major retenció del fàrmac, i en conseqüència, demostra la capacitat d'extrusió d'aquest per part de les cèl·lules i la capacitat d'inhibició dels transportadors implicats per part de l'I1. La línia I83 va mostrar capacitat d'extrusió de MTX i Doxo, a diferència de la línia I83 diploide, que només va mostrar capacitat d'extrusió de Doxo. La línia Mec1 va mostrar capacitat d'extrusió de Doxo i Rho123.

Havent confirmat que les tres línies tenien capacitat diferencial d'extrusió de fàrmacs i que la curcumina podia modular aquesta extrusió, es va procedir a mesurar la interacció de la curcumina, diferents fàrmacs i de la seva combinació amb curcumina sobre aquest potencial mecanisme de resistència a la quimioteràpia. Per avaluar l'efecte es va calcular la IRF amb la fórmula prèviament descrita:

$$IRF = \frac{MIF (\text{Compost testat}) - MIF (\text{Control negatiu})}{MIF (\text{Control negatiu})} \times 100$$

Per mesurar l'efecte de la curcumina i els fàrmacs sobre l'extrusió de MTX, es van utilitzar les línies cel·lulars I83, Mec1 i EHEB. Tal com s'ha comentat prèviament, en totes tres línies hi havia extrusió de MTX, que era inhibida per la curcumina (**Figura 52**). La línia que presentava una major inhibició de l'extrusió per part de la curcumina va ser I83 (IRF = 99,75%), seguida de Mec1 (IRF = 78,87%) i EHEB (IRF = 49,13%) (**Taula 12**).

Posteriorment, es va avaluar l'efecte que podien tenir diferents fàrmacs antileucèmics (fludarabina, citarabina, ibrutinib i venetoclax) inhibint l'extrusió de MTX. Els diferents fàrmacs estudiats van incrementar la intensitat de fluorescència de la MTX en les cèl·lules testades (**Figura 52**). L'ibrutinib va tenir l'efecte més alt (IRF = 262% en les I83, 130% en les Mec1 i 91,13% en les EHEB). La fludarabina, la citarabina i el venetoclax van tenir un efecte més reduït, amb una IRF al voltant de 20% en les I83, al voltant de 35% en les Mec1, i al voltant de 12% en les EHEB, per tots tres fàrmacs (**Taula 12**).

La combinació dels fàrmacs amb la curcumina va incrementar les intensitats de fluorescència de la MTX, sobretot en els fàrmacs que tenien un menor efecte per sí sols (**Figura 53**). Així, per fludarabina, citarabina, ibrutinib i venetoclax, les IRF en afegir la curcumina, i calculades amb les MIF del fàrmac sol i en combinació amb la curcumina, van ser respectivament 62%, 70%, 12% i 60% en les I83; 21%, 27%, -7% i 16% en les Mec1; i 28%, 31%, -4 i 24% en les EHEB (**Taula 13**).

Taula 12: IRF produïda per la curcumina i diferents fàrmacs.

| | I83P (MIF) | IRF (%) | Mec1 (MIF) | IRF (%) | EHEB (MIF) | IRF (%) |
|---------------------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| MTX | 6440 | | 13132 | | 21210 | |
| MTX + Cur 5 µM | 12864 | 99,75 | 23489 | 78,87 | 31631 | 49,13 |
| MTX | 11832 | | 21903 | | 29780 | |
| MTX + Fluda 10 µM | 14362 | 21,38 | 28824 | 31,60 | 34259 | 15,04 |
| MTX | 12106 | | 20746 | | 30062 | |
| MTX + Cit 0,01 µM | 14193 | 17,24 | 28516 | 37,45 | 32870 | 9,34 |
| MTX | 10462 | | 24446 | | 29204 | |
| MTX + Ibru 10 µM | 37872 | 262,00 | 56363 | 130,56 | 55817 | 91,13 |
| MTX | 12729 | | 22474 | | 30570 | |
| MTX + Veneto 10 nM | 15824 | 24,31 | 30749 | 36,82 | 34317 | 12,26 |

Taula 13: IRF produïda per la curcumina en combinació amb els diferents fàrmacs testats prèviament.

| | I83P (MIF) | IRF (%) | Mec1 (MIF) | IRF (%) | EHEB (MIF) | IRF (%) |
|------------------------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| MTX+ Fluda 10µM | 14362 | | 28824 | | 34259 | |
| MTX+ Fluda 10 µM + Cur 5 µM | 23215 | 61,64 | 34860 | 20,94 | 43834 | 27,95 |
| MTX+ Cit 0,01µM | 14193 | | 28516 | | 32870 | |
| MTX+ Cit 0,01 µM + Cur 5 µM | 24083 | 69,68 | 36176 | 26,86 | 43025 | 30,89 |
| MTX+ Ibru 10µM | 37872 | | 56363 | | 55817 | |
| MTX+ Ibru 10 µM + Cur 5 µM | 42252 | 11,57 | 52492 | -6,87 | 53762 | -3,68 |
| MTX+ Veneto 10nM | 15824 | | 30749 | | 34317 | |
| MTX+ Veneto 10 nM + Cur 5 µM | 25293 | 59,84 | 35721 | 16,17 | 42471 | 23,76 |

En aquest cas, la IRF es va calcular amb les MIF del fàrmac sol com a control negatiu i la seva combinació amb curcumina com a compost testat, seguint la fórmula prèviament descrita.

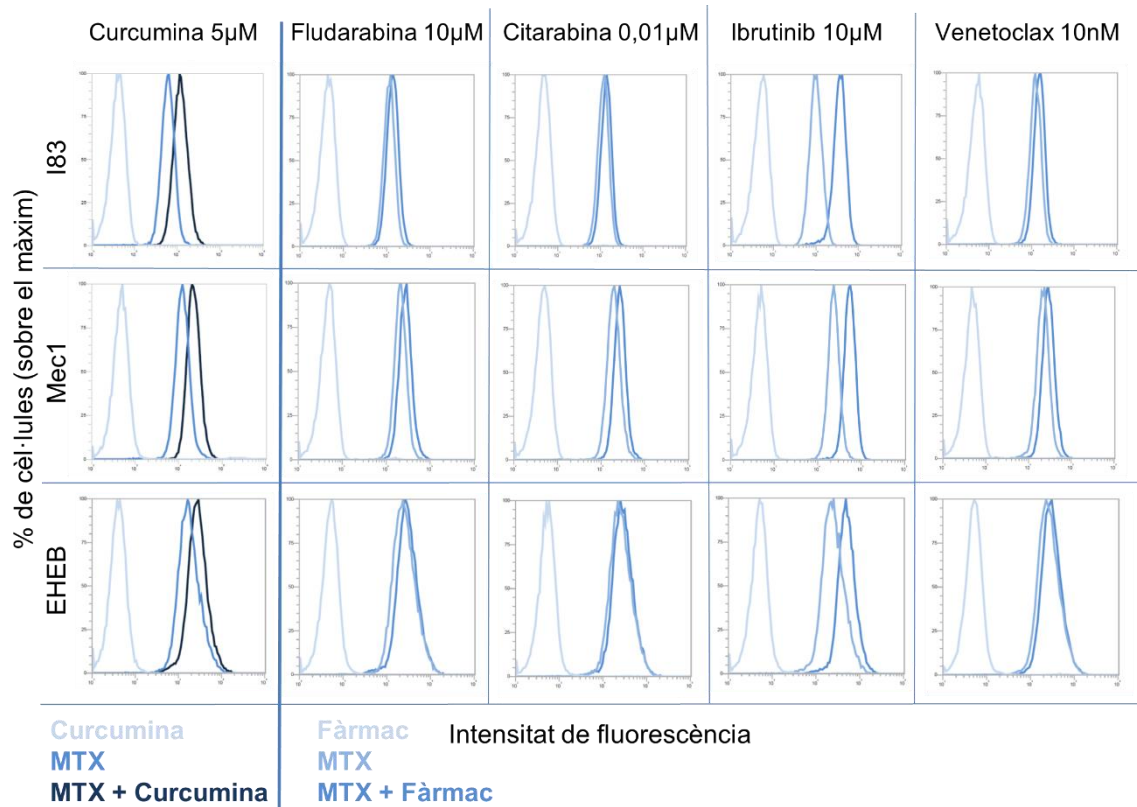


Figura 52: Efecte inhibitor de la curcumina i de diferents fàrmacs antileucèmics sobre l'extrusió de MTX. Tots els compostos testats van mostrar un efecte inhibitor de l'extrusió de MTX en les tres línies cel·lulars. L'ibrutinib i la curcumina van presentar el major efecte inhibitor.

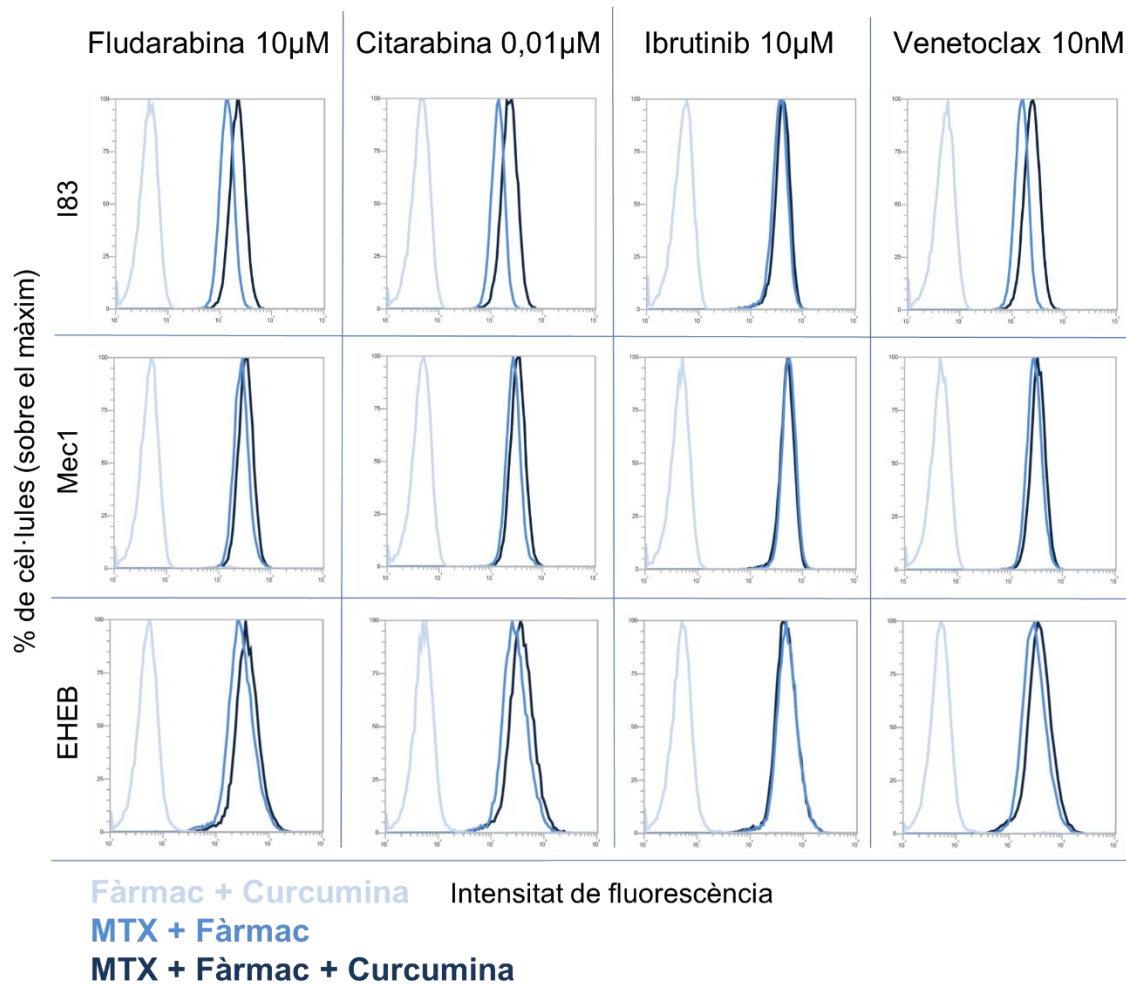


Figura 53: Efecte potenciador de la curcumina de la inhibició produïda per diferents fàrmacs antileucèmics sobre l'extrusió de MTX. La combinació amb curcumina va incrementar la inhibició de l'extrusió de MTX produïda per la fludarabina, la citarabina i el venetoclax.

5. La curcumina té un efecte modulador sobre l'activitat fosfatasa alcalina en les línies cel·lulars estudiades de LLC

Per determinar l'activitat de l'enzim fosfatasa alcalina (*Alkaline Phosphatase*, ALP) de les diferents línies cel·lulars i l'efecte que la curcumina podia tenir sobre l'activitat d'aquest enzim, es va utilitzar el reactiu APLS, un substrat profluorogènic de l'ALP. L'APLS només es troba disponible comercialment amb excitació amb làser blau. Per evitar resultats artefactuals, s'ha tingut en compte que existeix cert grau de solapament entre les emissions de la curcumina i l'APLS quan són excitades amb aquest làser. Les concentracions d'incubació amb curcumina utilitzades van mostrar un impacte reduït sobre la intensitat de fluorescència en el mateix canal, de manera que va ser possible avaluar el seu efecte sobre l'activitat de l'enzim.

Per cada concentració de curcumina estudiada es va realitzar una anàlisi utilitzant una alíquota marcada amb APLS i una altra sense marcar, per tal d'establir un blanc de referència. Comparant la MIF de la mostra marcada amb APLS amb la de la mateixa mostra sense afegir APLS, es va obtenir la IRF. D'aquesta manera, la fluorescència produïda per l'APLS es va valorar tenint en compte la fluorescència basal que produïa la curcumina. La IRF es va calcular amb la fórmula ja utilitzada prèviament per valorar la producció de ROS i l'extrusió de fàrmacs:

$$IRF = \frac{MIF (\text{Curcumina } x \mu\text{M} + \text{APLS}) - MIF (\text{Curcumina } x \mu\text{M})}{MIF (\text{Curcumina } x \mu\text{M})}$$

A partir de les IRF obtingudes per cada concentració de curcumina, es va calcular l'increment de IRF respecte al control negatiu, dividint la IRF de cada concentració de curcumina entre la IRF de la mostra tractada amb curcumina 0 μM (DMSO). Els valors superiors a 1 indiquen un increment en la intensitat de fluorescència respecte al control, mentre que els valors inferiors a 1 indiquen una disminució.

L'ús de la curcumina no va produir un efecte clar en l'activitat fosfatasa alcalina fins a concentracions prou elevades en I83 i Mec1. A aquestes concentracions, que van ser 10 μM per les I83 i 5 μM per les Mec1, la curcumina va produir una disminució de l'activitat (**Figura 54, Taula 14**). A 5 μM , la curcumina també va produir una disminució de l'activitat en les I83, però molt lleu. Els efectes de la concentració 10 μM en les Mec1 no es mostren a la figura perquè van generar una gran disrupció, que va impossibilitar l'obtenció d'un resultat. A la dosi 1 μM , la curcumina va augmentar lleugerament l'activitat de la fosfatasa alcalina respecte al control negatiu en Mec1.

Les EHEB van seguir una resposta totalment diferent. Només es va observar una lleu disminució de la fluorescència a la concentració més baixa de curcumina testada, 1 μM . A dosis més elevades de curcumina, es va observar un increment de la fluorescència (**Figura 54, Taula 14**).

Els resultats exposats corresponen a les 72 hores d'incubació amb curcumina, moment en què l'efecte era més evident, tot i que ja es podia detectar a les 24 hores.

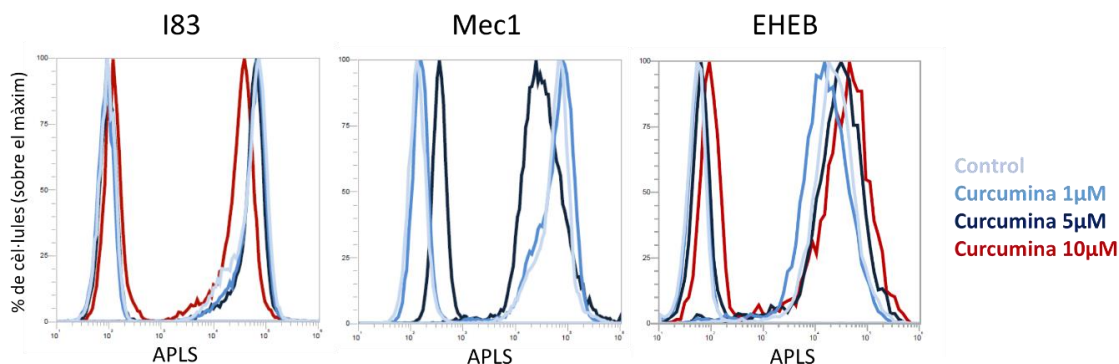


Figura 54: Efecte de la curcumina sobre l'activitat fosfatasa alcalina. La curcumina va modular l'activitat de la fosfatasa alcalina en el models cel·lulars de LLC testats, amb variacions importants segons la dosi i la línia cel·lular. Els pics de l'esquerra de cada gràfic corresponen a les intensitats de fluorescència dels blancs, és a dir, a l'alíquota sense APLS, mentre que els de la dreta corresponen a les mateixes dosis de curcumina marcant amb APLS. La curcumina va produir certa fluorescència, com s'extreu de l'increment de les intensitats de fluorescència dels blancs a dosis creixents de curcumina. La curcumina 10 i 5 μM van disminuir l'activitat fosfatasa alcalina en I83 i Mec1 respectivament, com s'extreu del desplaçament dels pics marcats amb APLS cap a l'esquerra respecte al control.

Taula 14: Efecte de la curcumina sobre l'activitat fosfatasa alcalina.

| | I83 (MIF) | IRF | ΔIRF | Mec1 (MIF) | IRF | ΔIRF | EHEB (MIF) | IRF | ΔIRF |
|------------|-----------|--------|--------------------|------------|--------|--------------------|------------|--------|--------------------|
| Cur0 APLS | 62506 | | | 67933 | | | 32430 | | |
| Blanc | 97 | 643,39 | 1,00 | 189 | 358,43 | 1,00 | 108 | 299,28 | 1,00 |
| Cur1 APLS | 62909 | | | 75112 | | | 24295 | | |
| Blanc | 97 | 647,55 | 1,01 | 172 | 435,70 | 1,22 | 84 | 288,23 | 0,96 |
| Cur5 APLS | 61786 | | | 50816 | | | 42416 | | |
| Blanc | 106 | 581,89 | 0,90 | 366 | 137,84 | 0,38 | 85 | 498,01 | 1,66 |
| Cur10 APLS | 38345 | | | - | - | - | 58400 | | |
| Blanc | 127 | 300,93 | 0,47 | - | - | - | 106 | 549,94 | 1,84 |

Per cada línia cel·lular, es presenten tres columnes de valors. **Mitjana d'intensitat de fluorescència (MIF)** per cada tractament, marcant amb APLS o sense marcatge. **Intensitat relativa de fluorescència (IRF)**, que s'obté de dividir la diferència de la MIF d'un tractament amb marcatge i sense amb la MIF del mateix tractament sense realitzar marcatge. **Increment de la IRF**, que s'obté de dividir la IRF de cada tractament amb la IRF del control, és a dir, de les cèl·lules tractades amb curcumina 0 μM . Els increments de IRF majors de 1, marcats amb blau fosc, indiquen un increment de la intensitat de fluorescència respecte al control, mentre que els menors a 1, marcats amb blau clar, indiquen una disminució.

6. Efecte de la curcumina sobre l'activitat caspasa

Per a l'estudi de l'activitat de les caspases en la LLC i el potencial efecte modulador de la curcumina sobre aquesta, es va posar a punt una tècnica utilitzant una sonda profluorogènica compatible amb l'espectre d'emissió de fluorescència de la curcumina. Amb aquest fi es van realitzar múltiples proves, per determinar, entre d'altres factors, el moment òptim per a realitzar l'anàlisi, el temps d'incubació òptim del marcatge, i l'activitat caspasa basal de diverses mostres de LLC.

La majoria de proves es van realitzar sobre cèl·lules obtingudes de mostres de sang perifèrica de pacients de LLC, ja que els models cel·lulars presentaven una distribució molt uniforme de les cèl·lules en funció de la seva activitat caspasa. Es va començar realitzant assaigs directament sobre mostres de sang de pacients de LLC, a diferents temps de la seva extracció, sense lisi dels eritròcits. Les mostres presentaven una activitat caspasa molt reduïda a temps propers al moment d'extracció de la mostra (**Figura 55 A**), que anava augmentant amb el temps (**Figura 55 B**). Passats diversos dies de l'extracció, la intensitat de les caspases disminuïa, i resultava més evident la discriminació per PI (**Figura 55 C**).

Els resultats obtinguts indicaven que les mostres tindrien un punt òptim per a la realització de l'anàlisi, que se situaria al voltant de les 24 hores a partir de l'inici de l'estímul aplicat. Els temps inferiors a 12 hores van mostrar una resposta menor en general, i en alguns casos, nul·la. A temps de 48 hores o superiors, la resposta de les caspases havia disminuït, i en alguns casos semblava totalment esgotada.

Posteriorment, per tal de poder analitzar l'efecte de la curcumina i diversos fàrmacs, es van establir les cèl·lules en cultiu primari i se'ls van aplicar diversos tractaments durant diferents temps d'incubació. A causa de l'heterogeneïtat de les mostres i que moltes de les anàlisis realitzades van ser proves preliminars o van anar dirigides a determinar els paràmetres per la posada a punt de la tècnica, els resultats finals adequats per avaluar l'efecte de la curcumina sobre les caspases van ser limitats, diversos i poc concloents. En total es van realitzar 10 anàlisis, utilitzant 5 mostres de sang de pacients de LLC diferents.

Per a l'inici de la incubació amb la curcumina o els fàrmacs en cèl·lules establertes en cultiu primari, és important tenir en compte el temps transcorregut des de l'establiment del cultiu. Passat poc temps de la manipulació de la sembra, les cèl·lules presentaven una activitat caspasa basal lleugerament augmentada, mentre que a temps gaire llargs, el cultiu envellia, hi havia menys cèl·lules vives, i les que quedaven presentaven una menor activació de les caspases en resposta a estímuls. El temps òptim per a l'inici de la incubació amb la curcumina es va establir a les 24 hores després de la sembra de les cèl·lules.

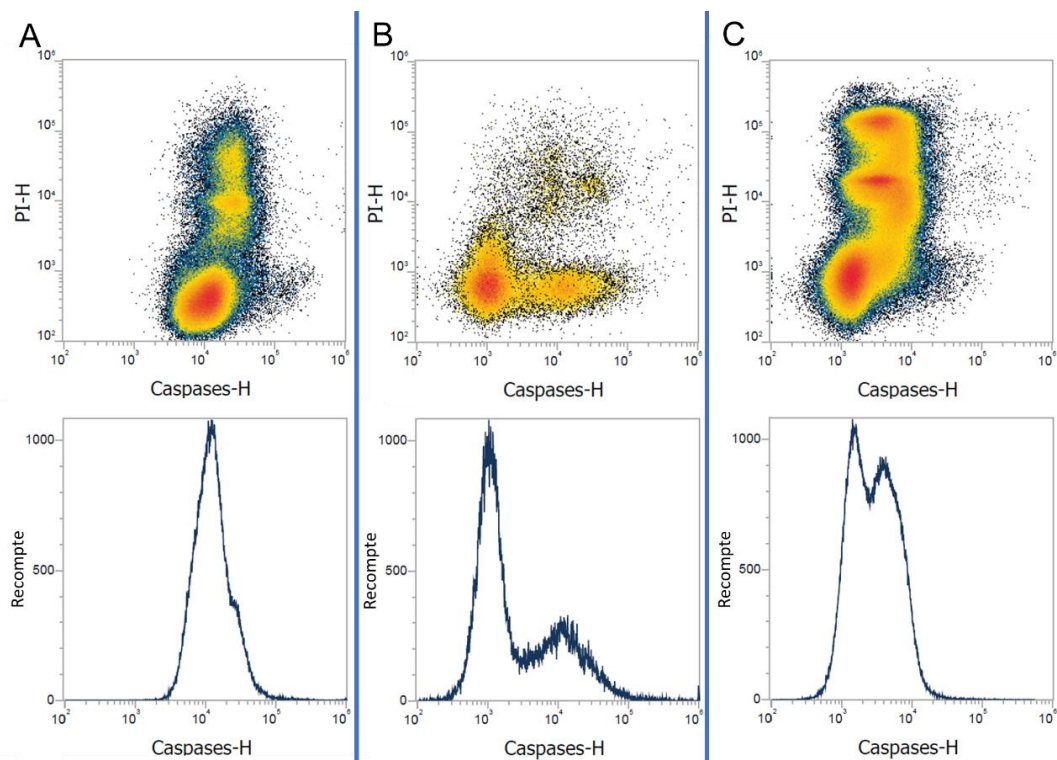


Figura 55: Efecte de l'envelliment de les mostres sobre l'activitat caspasa. Les cèl·lules obtingudes de sang perifèrica de pacients amb LLC presentaven nivells d'activitat de les caspases molt reduïts durant les primeres hores després de l'extracció (A). Al voltant de les 24 hores, s'observava un important augment de l'activitat de les caspases, que no anava lligat a un augment de la positivitat per PI (B). A partir de les 24 hores de l'extracció, les mostres presentaven un envelliment progressiu, amb una disminució de l'activitat de les caspases i un augment de la positivitat per PI (C). A, mostra del mateix dia (temps < 24h); B, 24 hores de l'extracció; C, 10 dies de l'extracció.

Els nivells de resposta i el moment en què es produïa el pic van variar entre mostres. El nombre de proves realitzades per establir aquests paràmetres va ser limitat, i per a estudis posteriors caldria realitzar més anàlisis per tal de confirmar-los i ajustar amb més precisió, si fos necessari, els temps de la tècnica. Tot i que en la majoria de les proves, les caspases no van augmentar en resposta a estímuls (**Figura 56 A i B**), el que indicaria una reducció de la sensibilitat a l'apoptosi per part de les cèl·lules, en un cas sí que es va observar un increment clar dels nivells de caspases activades en resposta a l'exposició a la curcumina 10 µM (**Figura 56 C**).

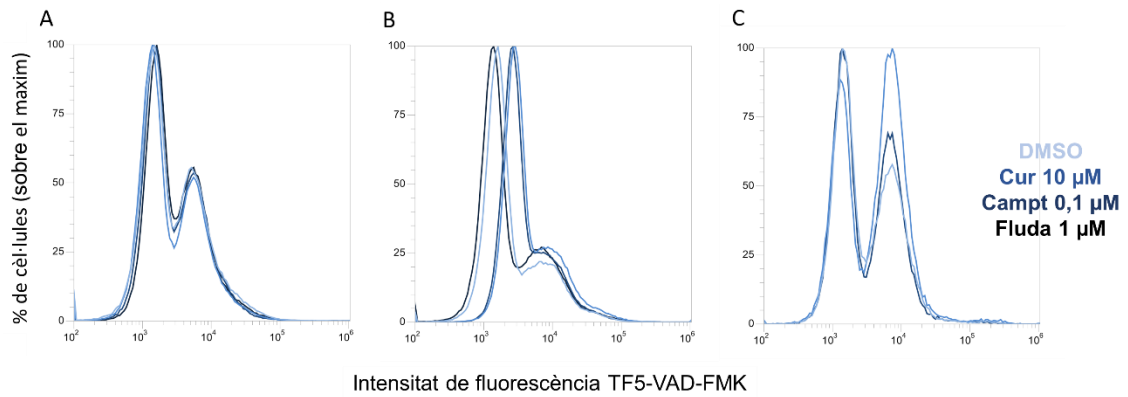


Figura 56: Nivells de caspases activades de diferents cultius primaris de LLC. El pic principal de l'esquerra correspon a cèl·lules amb nivells baixos de caspases, mentre que el pic menor correspon a cèl·lules amb nivells incrementats. La manca d'increment del pic menor en A i B en resposta a l'exposició a curcumina 10 μ M, camptotecina 0,1 μ M i fludarabina 1 μ M, indica que les cèl·lules d'aquest cultiu no activen les caspases en resposta a estímuls proapoptòtics. L'increment del pic en C demostra que la curcumina tindria la capacitat d'induir aquesta activació en certes mostres.

7. Anàlisi de l'efecte sinèrgic de la curcumina i fàrmacs en cultius primaris de LLC

Per tal de determinar el potencial efecte sinèrgic de la curcumina en combinació amb diversos fàrmacs utilitzats en la teràpia de la LLC, es van realitzar diverses incubacions sobre cultius primaris establerts a partir de mostres de sang perifèrica anticoagulada amb EDTA.

Les mostres de sang perifèrica es van obtenir de diversos pacients amb LLC. Es van recollir diferents dades d'aquests pacients, que poguessin tenir rellevància clínica: edat, sexe, factors de risc, tractaments rebuts i història clínica. D'alguns pacients se'n va estudiar més d'una mostra, ja que es van rebre extraccions de sang realitzades en diferents moments en el temps. D'altra banda, de cada mostra de la qual es van establir cultius primaris, se'n va realitzar almenys 1 experiment, que va constar de 5 anàlisis: t_0 , control (tractament amb DMSO), tractament amb curcumina 5 μM , tractament amb fàrmac i tractament amb fàrmac combinat amb curcumina 5 μM . D'algunes mostres se'n va realitzar més d'un experiment, a causa que es va estudiar més d'un fàrmac, es van analitzar diferents concentracions de fàrmac (en el cas de la fludarabina) o es va analitzar el mateix cultiu primari a diferents temps d'incubació.

D'altra banda, per a cada anàlisi realitzada es va obtenir informació de diferents paràmetres, tres dels quals es van utilitzar per avaluar l'estat de la mostra i els efectes dels tractaments. En primer lloc, el percentatge de cèl·lules negatives per PI, que representa les cèl·lules amb membrana cel·lular intacta i dona una idea de la **viabilitat**.

En segon lloc, dins de la fracció PI negativa, es van estudiar les cèl·lules positives per CD19 i CD5. La coexpressió d'aquests dos marcadors permet identificar la **fracció leucèmica**, és a dir, el percentatge de cèl·lules de LLC.

Finalment, dins de la fracció leucèmica, es van estudiar les cèl·lules amb més marcatge per APLS. Com que l'APLS permet estudiar cèl·lules més immadures i primitives, aquesta fracció serveix per identificar cèl·lules amb característiques pròpies de **cèl·lules mare leucèmiques**.

La **Figura 57** mostra l'exemple d'un experiment i de l'estratègia d'anàlisi seguida, a partir de la qual s'obtenen els valors numèrics dels diferents paràmetres estudiats.

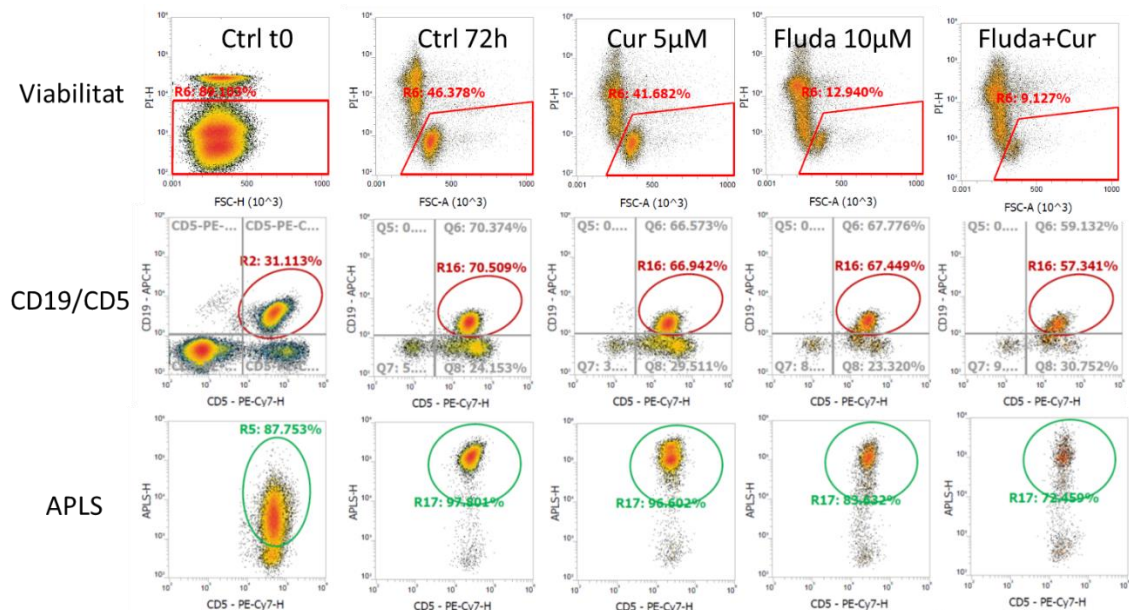


Figura 57: Estratègia d'anàlisi de les mostres i els cultius primaris. Cada experiment consta de 5 anàlisis, que corresponen a les columnes de la figura: temps zero, analitzat directament sobre la mostra de sang perifèrica; i control i tractaments amb curcumina, fàrmac i fàrmac combinat amb curcumina, analitzat sobre cèl·lules dels cultius primaris passat el temps d'incubació amb els diferents tractaments. Per a cada anàlisi s'obtenen els tres paràmetres indicats a les files de la figura: viabilitat, cèl·lules positives per CD19 i CD5 i activitat ALP.

7.1. Característiques dels pacients

En total es van analitzar 52 mostres de sang perifèrica, obtingudes de 46 pacients de LLC. D'aquestes dades, no totes s'han utilitzat en la present Tesi, només s'han avaluat aquelles amb què s'han establert cultius primaris. Tot i això, les dades obtingudes de totes les mostres analitzades poden ser útils en un futur per establir una associació entre els nivells de fosfatasa alcalina i la progressió de la malaltia, com a part d'un estudi prospectiu més extens.

De les 52 mostres de pacients amb LLC, es va realitzar cultiu primari de 29 mostres, corresponents a 25 pacients diferents. D'un pacient se'n va obtenir i analitzar mostra de sang perifèrica en dos seguiments, mentre que d'un altre, se'n va obtenir i analitzar en quatre seguiments diferents. Les edats dels pacients van estar compreses entre 53 i 88 anys, amb una mitjana d'edat de 72 anys i una mediana de 72 anys, en un rang de 53 a 88 anys. Es van analitzar 8 mostres de pacients de sexe femení i 21 mostres provinents de 17 pacients diferents de sexe masculí. Com a apunt a aquesta desviació, val la pena remarcar que la LLC és més freqüent en homes que en dones.

Separat per sexes, l'edat mitjana dels homes va ser de 71 anys, i la de les dones, 74 anys. L'edat mediana dels homes va ser de 71 anys, i la de les dones, 77 anys.

També es van analitzar 4 mostres control, obtingudes de pacients amb altres trastorns però sense afectació en els recomptes hematològics, corresponents a dos pacients de sexe masculí i dos de sexe femení. Les edats van estar compreses entre 23 i 80 anys.

A continuació es mostra una taula amb les dades clíniques dels diferents pacients dels quals se'n van establir cultius primaris (*Taula 15*). D'alguns pacients no se'n van poder obtenir totes les dades.

Taula 15: Dades dels pacients de LLC estudiats.

| | Recòmpte leucòcits (x10 ⁶ /L) | Edat | Sexe | % CD19+CD5+ | % APLS + (sobre CD19+CD5+) | Estat | Tractament | Factors pronòstic |
|-------------------|--|------|------|-------------|----------------------------|---|---|--|
| | 5,3 | 72 | M | 0,776 | 11,673 | Resposta parcial, 0,03% de MMR. | Ibrutinib+Ofatumumab | Del13q14 (DLEU) i 11q22 (ATM) en 86% dels nuclis. |
| | 1,9 | 71 | M | 0,02 | 25 | Remissió completa. | Rituximab-Bendamustina | Del13q, IGHV mutat. |
| | 12,5 | 63 | M | 28,042 | 0,804 | Leucocitosi des de 2012, elements de LLC. | R-CHOP (6 cicles) | Citogenètica:+13; t(14;19). LLC en transformació però sense criteris de Richter. |
| Pacient 21 | 7,6 | 65 | M | 9,917 | 6,319 | Resposta parcial, 35% de MMR. | Ibrutinib, sol i combinat amb Ofatumumab | del13q14, del(11q) (ATM), ZAP70+ . BinetB, Rai1 |
| | 7,8 | 65 | M | 8,647 | 2,453 | Resposta parcial, 33% de MMR | | |
| | 7,4 | 65 | M | 14,616 | 6,495 | Resposta parcial, 29% de MMR. | | |
| | 8,6 | 65 | M | 1,597 | 0,158 | Resposta parcial, 28% de MMR. | | |
| | 13 | 70 | F | 55,234 | 85,899 | 55% de MMR. | | Del11(q21q25) (ATM), del13 (q14q21) (DLEU) |
| Pacient 29 | 11,8 | 79 | M | 46,745 | 0,343 | Limfocitosi, 86% de limfòcits amb fenotip LLC que superen per poc els 5000 /µL, cal seguiment per confirmar LLC. | Cap | |
| | 16,7 | 79 | M | 17,287 | 0,052 | Binet-RaiA1. 87% de MMR, confirmació de LLC. | | |
| | 128 | 83 | F | 82,265 | 93,923 | | Cap | |
| | 13 | 80 | F | 31,113 | 87,753 | Diagnòstic. | Cap | |
| | 26,4 | 80 | F | 73,914 | 70,039 | Limfocitosi progressiva. 84% de limfòcits amb fenotip de LLC. Binet III, Rai3 (limfocitosi + anèmia), recaiguda-progressió. | Tx1: Obinutuzumab + Clorambucil. Tx2: Ibrutinib (intolerància). Tx3: R-idealisis (intolerància). Pendent de provar Venetoclax | t(12,13)(q14,15), del13. |

| | | | | | | | | |
|-------|--------------------------|----|---|--------|--------|---|--|---|
| CLL34 | 5,7 | 74 | M | 1,3 | 5,221 | Resposta parcial, 68% dels limfòcits B tenen fenotip de LLC. RaiIV Binet C. Pràcticament en RC. | Ibrutinib | IGHV no mutat. |
| CLL35 | 7,1 | 74 | F | 26,492 | 5,236 | Recaiguda incipient, 48% de limfòcits LLC en sang perifèrica. Germà amb LLC. | Tx1: R-CHOPx6 i TITx6, radioteràpia. AutoTPH | del13q. |
| CLL36 | 10 | 66 | M | 44,491 | 1,911 | 69% de CD19/CD5. | Cap | |
| CLL37 | 13,6 | 67 | M | 27,716 | 34,293 | 51% de CD19/CD5. Diagnòstic recent. | Cap, seguiment amb controls. | |
| CLL38 | 7,9 | 56 | M | 21,358 | 85,838 | Recaiguda, estadi IV, MMR en sang perifèrica de 25%. | Tx1: R-FC (2010), Tx2: R-idealisisib (2016), Tx3: ibrutinib (2016), inici venetoclax | ZAP70+ , del(13q14) (DLEU). Cariotip alterat, del TP53 |
| CLL39 | 154 | 77 | M | 92,646 | 88,506 | Progressió. 91% de limfòcits CD19/CD5. | | FISH: del(13q14)(DLEU), del(17p13)(TP53) en 23% dels nuclis. |
| CLL40 | 13800 limfòcits/ μ L | 81 | M | 54,798 | 96,777 | Recaiguda. MMR en sang perifèrica: 90%. | | del(11q22) (gen ATM). |
| CLL41 | 10,9 | 71 | M | 53,99 | 2,516 | MMR: 85%. Recaiguda incipient. | R-FC | del(13q14)(D13S319) |
| CLL43 | 89,5 | 79 | M | 94,154 | 0,247 | Progressió. 95% de limfòcits CD19/CD5. | | del(13q14)(DLEU). |
| CLL44 | 13,2 | 71 | F | 69,002 | 82,096 | Diagnòstic, 75% de CD19/CD5. BinetA, Rai1. | Cap | |
| CLL45 | 24600 limfòcits/ μ L | 53 | F | 64,385 | 0,028 | Progressió. MMR en sang perifèrica: 75%. | | del(13q14) (DLEU) bial·lèlica en un 92% per FISH. |
| CLL46 | 114 | 88 | M | 86,879 | 0,192 | | | Trisomia 12. |
| CLL47 | 16,3 | 79 | M | 51,03 | 0,034 | Diagnòstic, 75% de CD19/CD5. | | |
| CLL48 | 18,2 | 73 | M | 55,723 | 0,069 | Diagnòstic, 74% de CD19/CD5. Estadi A1. | Cap | Trisomia 12, del(13q14) (DLEU) |
| CLL49 | 10,5 | 81 | F | 3,887 | 0 | Dx el 2011. Progressió el 2017. 40% de limfòcits amb fenotip de LLC. | Tx1: Obinutuzumab + Clorambucil. Tx2: Ibrutinib (2018) | ZAP70+ , trisomia 12. Beta 2 microglobulina de 4,3 (setembre de 2019). |
| CLL52 | 78 | 62 | M | 54,284 | 0,016 | Diagnòstic. 85% de MMR en sang perifèrica. | | |

Els factors de risc advers estan marcats en negreta.

7.2. Factors de risc

Ja que hi ha mutacions i marcadors associats a un pitjor pronòstic i una menor resposta als tractaments, es va realitzar una anàlisi de la resposta de les mostres estudiades en funció dels factors de risc que presentessin els pacients.

De les 29 mostres estudiades, 12 corresponien a pacients amb factors de risc adversos (obtingudes de 9 pacients diferents) i 17 eren de pacients sense factors de risc advers coneguts (obtingudes de 16 pacients diferents). Entre els factors de risc advers observats, per ordre de freqüència, hi havia 7 mostres amb deleció 11q (obtingudes de 4 pacients diferents), 6 mostres positives per ZAP-70 (obtingudes de 3 pacients diferents), 3 mostres amb trisomia 12 i 2 mostres amb deleció 17p. També hi havia 13 mostres amb deleció 13q, 5 de les quals la presentaven aïllada, tot i que aquesta alteració s'associa a un millor pronòstic si no es presenta acompanyada d'altres alteracions i per tant no es considera un factor de risc advers (**Taula 15**).

A partir de l'anàlisi dels controls, es va observar que les mostres amb algun factor de risc advers tenien, de mitjana, percentatges lleugerament més baixos de cèl·lules leucèmiques que les que no tenien cap factor de risc advers (47,4% vs. 66,6%). Pel que fa al percentatge de cèl·lules leucèmiques amb nivells elevats d'ALP, va ser lleugerament major en les mostres que presentaven algun factor de risc advers (92,3% vs. 81,8%).

Per tal de poder comparar entre subgrups l'efecte produït pels diferents tractaments, es va calcular el paràmetre *Resposta* amb la fórmula que s'indica a continuació:

$$\text{Resposta} = \frac{\text{Valor (a)} - \text{Valor (b)}}{\text{Valor (a)}} \times 100$$

Per calcular la *Resposta al fàrmac*, es va establir el valor del *Control* per *a* i el del *Tractament amb fàrmac* per *b*. El mateix es va fer per determinar la *Resposta a la curcumina*, establint el valor *b* pel *Tractament amb curcumina*. Per determinar la *Resposta de la combinació de la curcumina amb el fàrmac*, es va establir el valor del *Tractament amb fàrmac* per *a* i el valor de la *Combinació del fàrmac amb la curcumina* per *b*.

La resposta a fàrmacs de la fracció leucèmica va ser lleugerament major en les mostres de pacients amb factors de risc advers que en les d'aquells pacients que no en presentaven (20,6% vs. 8,4%). També va ser major l'efecte d'afegir curcumina (19,3% vs. -0,7%), tot i que aquesta tenia un menor efecte tota sola en aquests pacients (7% vs. 16,3%).

Pel que fa a l'activitat ALP, l'efecte produït pels fàrmacs va ser semblant entre les mostres amb factors de risc advers o sense (40,9% vs. 36,8%), però en canvi, la curcumina va tenir un efecte major sobre les mostres amb factors de risc advers, tant en combinació amb els fàrmacs (40,3% vs. 21,3%) com sola (4,2% vs. -13,6%).

Com s'ha comentat prèviament, la LLC és una malaltia que presenta una gran heterogeneïtat en les mutacions. Hi ha moltes mutacions diferents que poden existir en els pacients, però alhora, la freqüència de cadascuna d'aquestes sol ser baixa. Aquest fet es compleix en l'estudi realitzat en aquesta Tesi, de manera que la majoria de mutacions es troben en un nombre massa baix de pacients com per extreure conclusions amb un mínim de solidesa estadística. A causa del baix nombre de mostres obtingut per cada alteració, només s'ha valorat la deleció 11q, que va ser la que presentava un major nombre de pacients.

Deleció 11q

S'han analitzat 7 mostres amb deleció 11q i 22 mostres sense aquesta deleció. De les 7 mostres amb la deleció, 4 pertanyien a un mateix pacient. Les mostres amb aquesta deleció tenien una fracció leucèmica menor que les que no la presentaven (mitjanes de 32,4% vs. 65,6%). Pel que fa al percentatge d'aquestes cèl·lules positiu per ALP, va ser una mica major en les mostres amb la deleció (93,4% vs. 84%).

La resposta a fàrmacs de la fracció de cèl·lules leucèmiques va ser major en les mostres amb del(11q) (30,3% vs. 9%). També va ser major l'efecte d'afegir curcumina al tractament amb fàrmac (44,2% vs. -1,8%), tot i que, curiosament, aquesta tenia un efecte menor tota sola (1,6% vs. 15,4%).

Pel que fa als efectes sobre les cèl·lules leucèmiques positives per ALP, la resposta a fàrmacs va ser una mica menor en les mostres amb la deleció (31,6% vs. 39,9%), tot i que la diferència va ser petita. En canvi, la combinació amb la curcumina va tenir un efecte major en les mostres amb del(11q) (53,4% vs. 22,6%), així com la curcumina per sí sola (7,5 vs. -10,2%).

De les mostres amb del(11q), 2 havien estat tractades amb fludarabina i 5 amb ibrutinib. D'aquestes 5, quatre corresponen al mateix pacient en diferents punts del seguiment.

7.3. Estudi de l'efecte sinèrgic de la curcumina sobre diferents fàrmacs antileucèmics

7.3.1. Fludarabina

Es van tractar 17 cultius primaris amb fludarabina, corresponents a mostres obtingudes de 16 pacients diferents. En total es van realitzar 23 experiments, ja que 3 mostres es van tractar amb fludarabina 1 μM (a més de la fludarabina 10 μM amb què es van tractar totes les mostres) i 3 mostres es van analitzar dues vegades, a dos temps d'incubació diferents. L'anàlisi dels controls va mostrar que aquests cultius tenien percentatges elevats de cèl·lules leucèmiques (valor mitjà de 76%, rang 31 - 97%), i nivells també relativament elevats de cèl·lules leucèmiques positives per ALP (valor mitjà de 82%, rang 22 - 99%).

La combinació de la fludarabina amb curcumina 5 μM no va tenir un efecte significatiu a l'hora de reduir la fracció leucèmica, ni combinada amb la dosi 10 μM ni amb la 1 μM de fludarabina. Tampoc van tenir un efecte significatiu la curcumina 5 μM ni la fludarabina 1 μM per separat, però sí la fludarabina 10 μM (**Figura 58**).

En general, la fludarabina i la curcumina van tenir un efecte molt poc selectiu sobre les cèl·lules leucèmiques. Tot i que en van disminuir el nombre en valors absoluts, ja que van reduir el percentatge de cèl·lules negatives per PI (gràfic no mostrat), no en van afectar el percentatge, ja que l'afectació sobre la viabilitat va afectar també les cèl·lules no leucèmiques de la mostra.

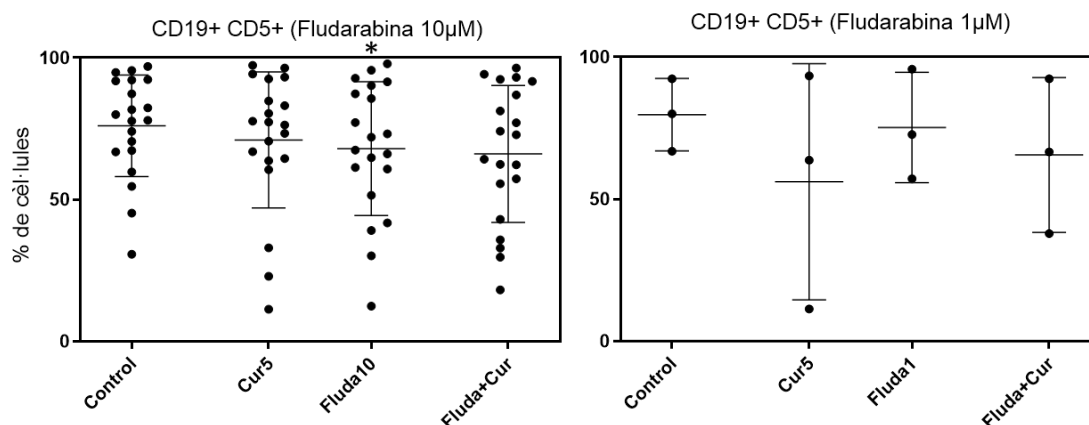


Figura 58: Efecte de la fludarabina, sola i en combinació amb la curcumina, sobre les cèl·lules CD19+ CD5+. La fludarabina 10 μM va produir una reducció lleu però significativa del percentatge de cèl·lules leucèmiques. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa al percentatge de cèl·lules leucèmiques positives per ALP, la combinació de la fludarabina 10 μM amb la curcumina el va reduir significativament respecte a la fludarabina sola (disminució del valor mitjà de 42,57 a 35,79%) (**Figura 59 A**). La combinació de la fludarabina 1 μM amb

curcumina, en canvi, no va tenir un efecte significatiu, tot i que cal tenir en compte que el nombre de mostres era molt reduït (**Figura 59 B**). La fludarabina 10 μM ja produïa una reducció important i significativa del percentatge de cèl·lules leucèmiques APLS+ respecte al control (disminució del valor mitjà de 82,12 a 42,57%), però no així la curcumina per sí sola (**Figura 59 A**).

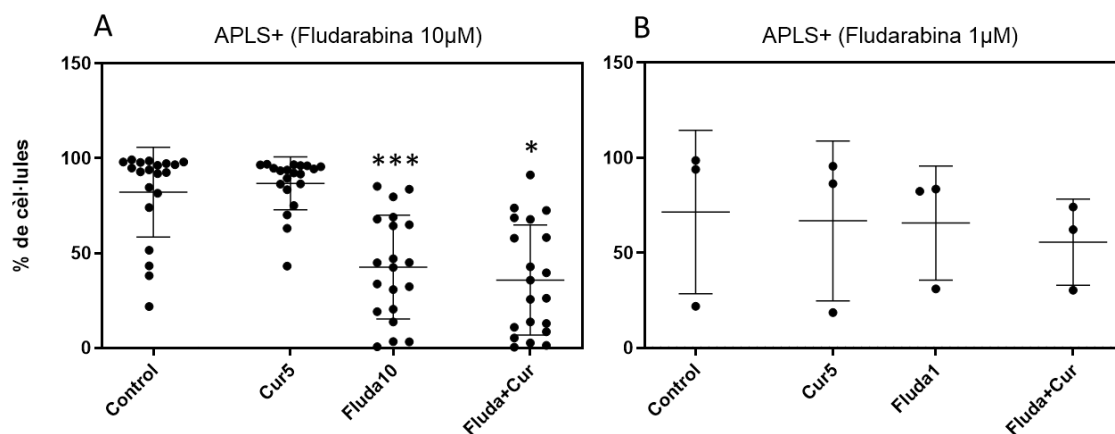


Figura 59: Efecte de la fludarabina, sola i en combinació amb la curcumina, sobre les cèl·lules CD19+ CD5+ APLS+. La fludarabina 10 μM va produir una reducció significativa del percentatge de cèl·lules leucèmiques APLS+. La combinació amb curcumina va potenciar significativament aquesta reducció. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

7.3.2. Ibrutinib

Es van tractar 8 cultius primaris amb ibrutinib 10 μM , corresponents a mostres obtingudes de 5 pacients diferents. L'anàlisi dels controls va mostrar que aquests cultius tenien percentatges relativament baixos de cèl·lules leucèmiques (valor mitjà de 21%, rang 1 - 32%), a causa que l'ibrutinib sol ser un fàrmac de segona línia i els pacients ja havien estat tractats prèviament. En canvi, els percentatges de cèl·lules leucèmiques APLS+ va ser molt elevat (valor mitjà de 96%, rang 93 - 99%).

La combinació de l'ibrutinib amb la curcumina no va tenir un efecte significatiu a l'hora de reduir la fracció leucèmica, respecte al fàrmac tot sol (reducció del 6,7% al 5,3% de mitjana). En canvi, la curcumina i l'ibrutinib per separat sí que van tenir un efecte significatiu, comparats amb el control negatiu, reduint el percentatge de cèl·lules leucèmiques de 21,33% a 14,22 i 6,72% respectivament (**Figura 60**).

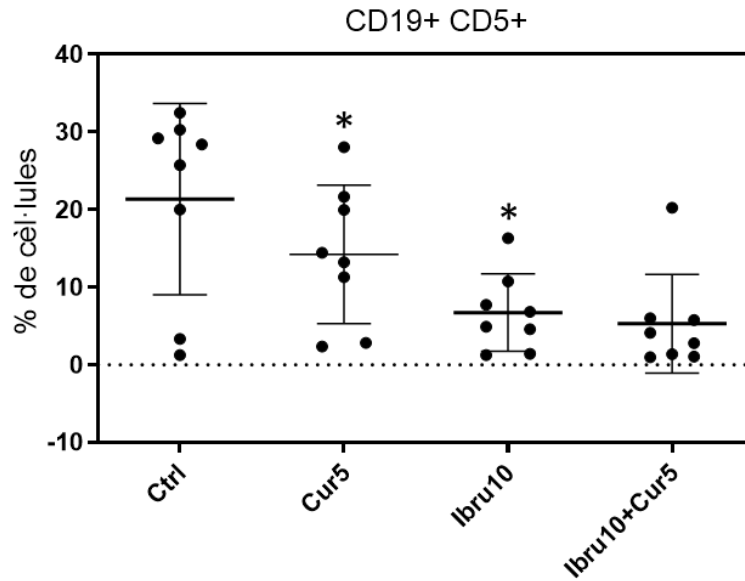


Figura 60: Efecte de l'ibrutinib, sol i en combinació amb la curcumina, sobre les cèl·lules CD19+ CD5+. Tant la curcumina 5 μ M com l'ibrutinib 10 μ M van produir una reducció significativa del percentatge de cèl·lules leucèmiques per separat. La combinació de l'ibrutinib amb la curcumina no va potenciar significativament l'efecte del fàrmac. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Pel que fa a l'efecte sobre la fracció leucèmica positiva per ALP, la combinació de l'ibrutinib amb la curcumina va tenir un efecte potent i significatiu a l'hora de reduir-ne el percentatge, en comparació amb l'ibrutinib tot sol (reducció del valor mitjà de 62,93 a 19,23%). La curcumina i l'ibrutinib per separat també van tenir un efecte significatiu respecte al control, reduint el percentatge de cèl·lules leucèmiques de 96,34% a 83,65 i 62,93% respectivament (**Figura 61**).

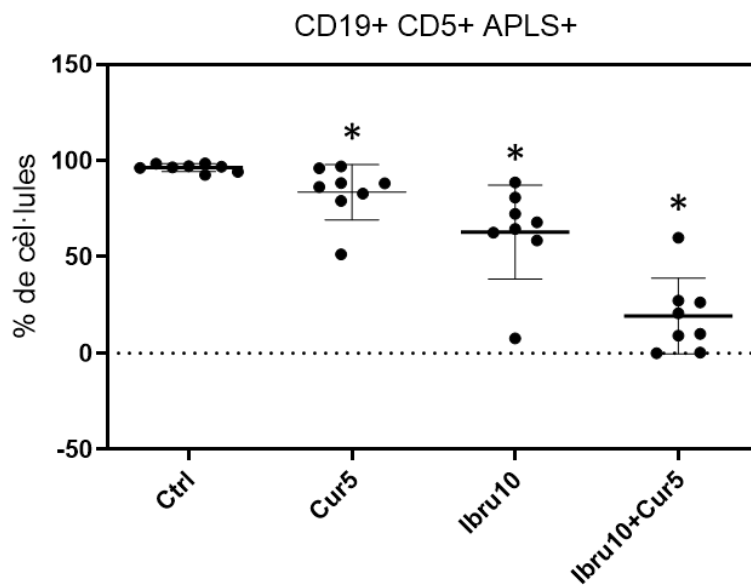


Figura 61: Efecte de l'ibrutinib, sol i en combinació amb la curcumina, sobre les cèl·lules CD19+ CD5+ APLS+. L'ibrutinib 10 μ M i la curcumina 5 μ M van produir una reducció significativa del percentatge de cèl·lules leucèmiques APLS+. La combinació de l'ibrutinib amb la curcumina va produir una potenciació significativa. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

L'ibrutinib va mostrar un efecte considerable en general. La combinació amb la curcumina va potenciar l'efecte en tots els casos, en alguns, de forma considerable, encara que aquest efecte no sempre fos significatiu.

En la mostra CLL33, la combinació amb curcumina va generar un augment del percentatge de cèl·lules leucèmiques (**Figura 62 A**). La causa és que aquesta combinació va produir molta mort cel·lular i es va disposar d'un nombre de cèl·lules molt reduït per a l'anàlisi, el que podria haver generat aquesta desviació. El nombre absolut de cèl·lules leucèmiques de la mostra clarament va disminuir, però també hi va haver molta afectació de les cèl·lules no leucèmiques.

De les mostres tractades amb ibrutinib, 4 corresponien a un mateix pacient. Totes les mostres d'aquest pacient van mostrar una resposta clara i uniforme, amb una evident potenciació de l'ibrutinib amb la combinació amb curcumina (**Figura 62 B**). Tot i això, el resultat no va ser significatiu degut al baix nombre de mostres.

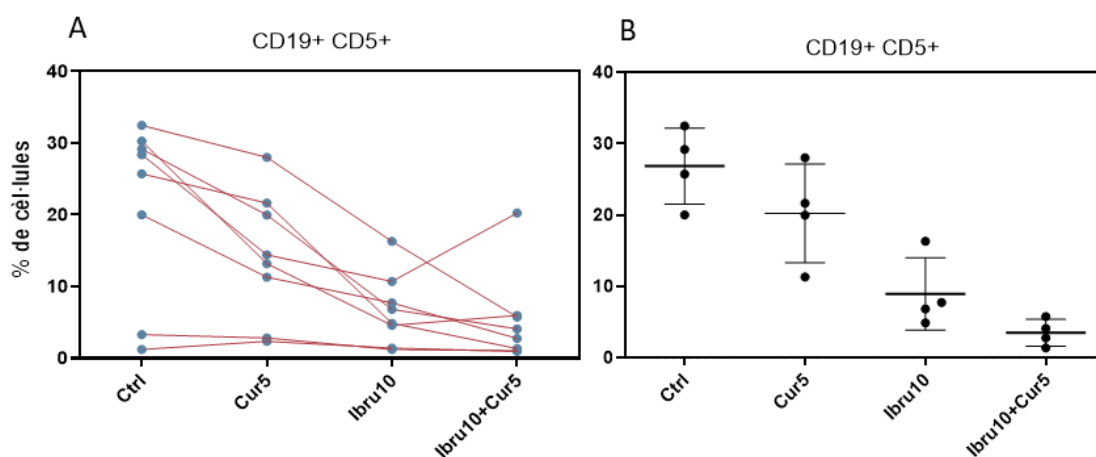


Figura 62: Efecte de l'ibrutinib, sol i en combinació amb la curcumina, sobre la fracció de cèl·lules leucèmiques. A Valoració individualitzada de les mostres; B Anàlisi de diferents mostres obtingudes d'un mateix pacient.

7.3.3. Rituximab

Es van tractar 5 cultius primaris amb rituximab 10 µg/mL, corresponents a mostres obtingudes de 5 pacients diferents. L'anàlisi dels controls va mostrar que aquests cultius tenien percentatges variables de cèl·lules leucèmiques (valor mitjà de 51%, rang 0,5 - 97%), i que aquestes presentaven percentatges molt elevats de cèl·lules APLS+ (valor mitjà de 95%, rang 92 - 100%).

Ni el rituximab, ni la curcumina, ni la combinació del rituximab amb la curcumina van produir citotoxicitat sobre les cèl·lules leucèmiques (**Figura 63**).

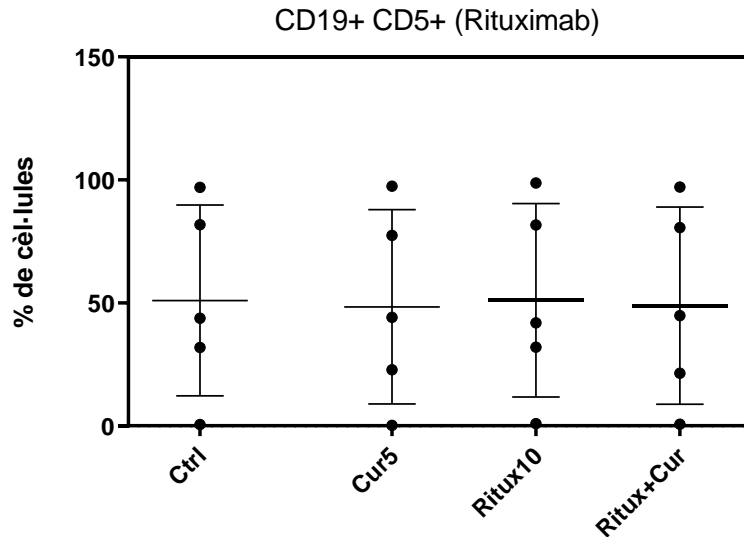


Figura 63: Efecte del rituximab, sol i en combinació amb la curcumina, sobre les cèl·lules CD19+ CD5+. Ni el rituximab 10 µg/mL, ni la curcumina 5 µM ni la seva combinació van produir cap efecte sobre el percentatge de cèl·lules leucèmiques.

Tampoc es va observar un efecte significatiu sobre el percentatge de cèl·lules leucèmiques APLS+ (**Figura 64 A**). Val la pena fixar-se en dues excepcions, en què el rituximab va reduir dràsticament el percentatge de cèl·lules APLS+. Es tracta de les mostres CLL18 (en què es va passar d'un 100% a un 0%) i de la CLL41 (en què es va passar d'un 95% a un 56%) (**Figura 64 B**). La curcumina, a més, semblava produir un efecte antagònic. D'aquests dos resultats, però, cal descartar la mostra CLL18, ja que el percentatge de cèl·lules leucèmiques del pacient era molt baix (0,5%), el que podria haver generat un artefacte. Pel que fa a la mostra CLL41, és possible que el rituximab tingués un cert efecte. Amb la combinació amb la curcumina, aquest efecte hauria quedat emmascarat perquè la viabilitat cel·lular general s'hauria reduït (**Figura 65**).

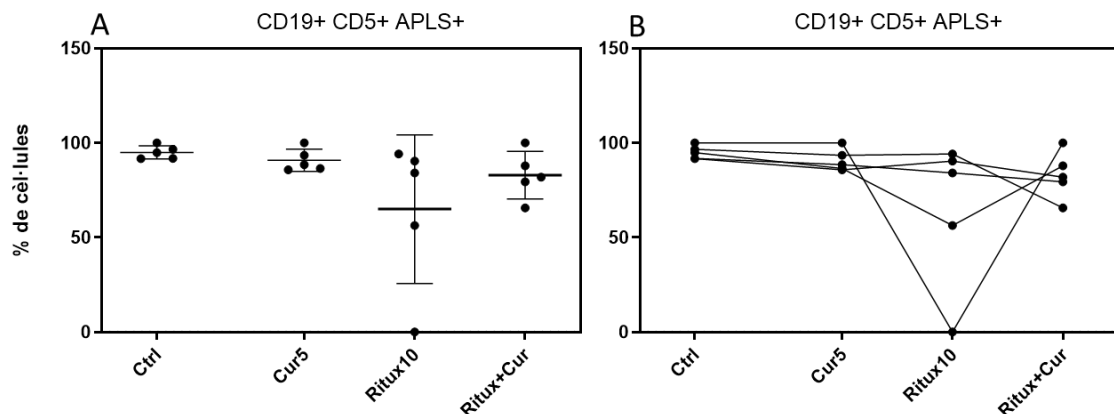


Figura 64: Efecte del rituximab, sol i en combinació amb la curcumina, sobre les cèl·lules CD19+ CD5+ APLS+. Ni el rituximab ni la seva combinació amb la curcumina van produir un efecte significatiu sobre la població de cèl·lules leucèmiques positives per ALP.

Tot i que el nombre de casos estudiats amb rituximab va ser reduït, la uniformitat dels resultats no porta a pensar que la manca d'un efecte significatiu fos causada per la baixa mida mostral. El rituximab tampoc va tenir cap efecte sobre la viabilitat general de les cèl·lules (**Figura 65**), fet que recolzaria que aquest fàrmac no produïa cap efecte sobre les cèl·lules.

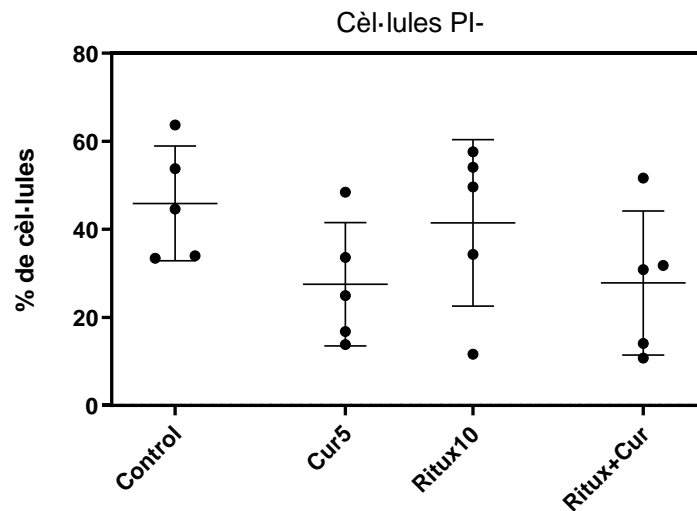


Figura 65: Efecte del rituximab, sol i en combinació amb la curcumina, sobre la viabilitat general de les cèl·lules. Ni el rituximab, ni la curcumina, ni la combinació dels dos, va tenir un efecte significatiu sobre la viabilitat general de les cèl·lules dels cultius. Val la pena remarcar que la curcumina va produir una reducció clara en la viabilitat, encara que no assolís nivells significatius.

La totalitat dels resultats numèrics obtinguts en les anàlisis dels cultius primaris es troben a la **Taula suplementària 8** de Material suplementari.

7.3.4. Controls

Els controls negatius obtinguts de mostres de pacients sense malalties hematològiques conegudes van presentar percentatges molt baixos de cèl·lules CD19+ CD5+ (mitjana de 0,56%), tal i com és normal en aquest tipus de mostres. Per aquest motiu, l'anàlisi dels efectes de la curcumina i els diferents fàrmacs es va centrar en la viabilitat de les cèl·lules.

Tot i que els efectes no van ser significatius en cap cas, ja que la mida mostral era petita, la fludarabina 10 μM i el venetoclax 100 nM van produir un efecte de toxicitat potent, reduint la mitjana de cèl·lules negatives per PI de 41,4% a 9 i 14,2% respectivament (**Figura 66 A i E**). La fludarabina 1 μM i l'ibrutinib 10 μM també van tenir un efecte de toxicitat, però en aquest cas menor, reduint el percentatge de 41,4% a 24,7 i 28,6% respectivament (**Figura 66 B i C**). La curcumina per sí sola va presentar molt poca toxicitat, reduint el percentatge de cèl·lules negatives per PI de 41,4% a 37,5%. Finalment, el rituximab no va generar toxicitat (**Figura 66 D**).

Pel que fa a la combinació amb els fàrmacs, la curcumina va produir un increment moderat en la toxicitat generada per la fludarabina 10 μM (**Figura 66 A**), 1 μM (**Figura 66 B**) i pel venetoclax 100 nM (**Figura 66 E**) (els percentatges de cèl·lules viables van passar de 9 a 6,7%; de 24,7 a 18%; i de 14,2 a 9,9%, respectivament). En canvi, la combinació amb l'ibrutinib va produir una toxicitat molt elevada, reduint el percentatge de cèl·lules viables de 28,6 a 13,9%, el que suposa una reducció de la viabilitat de més del 50% (**Figura 66 C**).

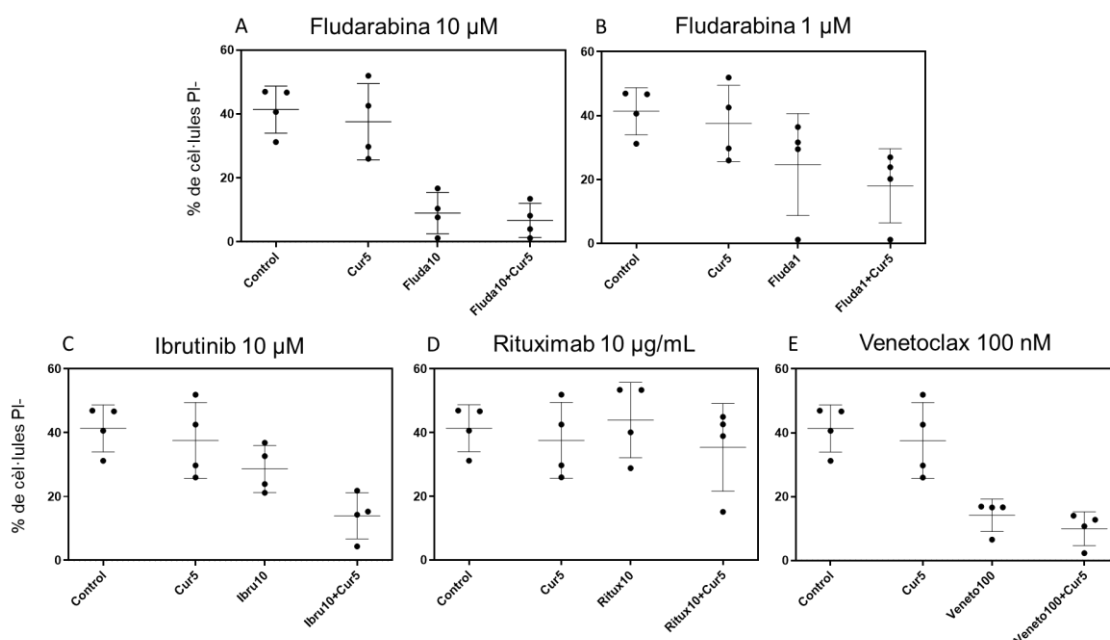


Figura 66: Efecte de la curcumina i els diferents fàrmacs testats sobre controls negatius, establerts a partir de mostres de sang perifèrica d'individus sense LLC ni altres malalties hematològiques conegudes. La fludarabina 10 μM i el venetoclax 100 nM van produir una elevada citotoxicitat sobre les cèl·lules dels controls negatius. La fludarabina 1 μM i l'ibrutinib 10 μM van produir un efecte citotòxic moderat, mentre que el rituximab no va produir efecte. La curcumina no va produir una citotoxicitat evident, sola ni en combinació amb els diferents fàrmacs, a excepció de l'ibrutinib, la combinació amb el qual va produir un important increment de la citotoxicitat.

Discussió

Antecedents

La LLC és una malaltia d'elevada incidència en països occidentals^{1,3,4}, que tot i no ser de les leucèmies més agressives, comporta una important reducció de la qualitat de vida dels pacients i presenta una baixa esperança de curació^{1,2}. Encara que sol aparèixer a edats relativament avançades, també hi ha un reduït percentatge de pacients que la contrauen abans¹. Els tractaments que s'han anat desenvolupant han permès cronificar la malaltia en molts casos, encara que produeixen importants efectes adversos afegits i no impedeixen que a llarg termini puguin aparèixer cèl·lules resistents als fàrmacs i que la malaltia progressi, requerint l'ús de tractaments més complexos i agressius. Aquesta progressió, sumada a d'altres condicions de salut dels pacients, pot acabar conduint a estadis en què la malaltia ja no és controlable. Cal recordar, a més, que tot i que es tendeix a associar la LLC amb un curs relativament lent i sostingut, hi ha casos en què la malaltia és agressiva, progressa ràpidament o no respon als tractaments^{23,25,26}. Així doncs, la cerca de nous compostos per millorar les teràpies té un gran interès per reduir els efectes adversos i millorar la qualitat de vida dels pacients, així com per mantenir estable la malaltia el màxim de temps possible, retardar-ne la progressió i allargar la supervivència.

Per tal com les cèl·lules de la LLC tenen unes taxes d'apoptosi reduïdes^{2,6,7}, la curcumina es presenta com una opció esperançadora per complementar alguns tractaments i millorar-ne l'eficàcia, ja que podria restablir els nivells d'apoptosi adequats i augmentar la sensibilitat a la quimioteràpia. D'altra banda, la curcumina presenta selectivitat per les cèl·lules tumorals i una baixa toxicitat a dosis efectives^{90,125,149,156,157}, de manera que podria ser adequada per administrar a pacients amb patologies prèvies, fins i tot de forma crònica.

Per aquest motiu, aquesta Tesi s'ha centrat en l'estudi del potencial efecte sinèrgic de la curcumina sobre diferents fàrmacs antineoplàsics, així com l'efecte sobre diferents mecanismes potencialment implicats en augmentar la sensibilitat a l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC.

Per aconseguir els propòsits plantejats, s'han utilitzat models cel·lulars i cultius primaris humans. Les línies cel·lulars serveixen com a models assequibles i relativament estables en les condicions habituals de cultiu, que permeten desenvolupar situacions experimentals reduint considerablement les variables d'estudi i permetent una expansió molt llarga en el temps i la reproductibilitat dels experiments. Són especialment útils, per tant, com a models per avaluar un efecte concret d'acord amb el mètode científic i de forma reproducible sota les condicions d'estudi. Pel que fa als cultius primaris, en aquest cas derivats de mostres de sang perifèrica, permeten avaluar els efectes sobre les cèl·lules del pacient de manera individualitzada. Tot i que les condicions de cultiu disten molt de les fisiològiques que hi ha en l'organisme (concentracions d'oxigen més elevades, efectes del tractament de lisi d'eritròcits, pèrdua del microambient cel·lular...), els cultius primaris s'acosten més a la realitat biològica dels pacients,

i permeten extreure resultats que poden mimetitzar l'efecte que es produiria *in vivo*.

Així doncs, en aquesta Tesi s'han utilitzat tres models cel·lulars derivats de LLC per avaluar els efectes que pot tenir la curcumina sobre la viabilitat cel·lular, la proliferació, el cicle cel·lular i la citomorfologia, quan és combinada amb diferents fàrmacs; l'efecte sobre la producció de ROS; sobre l'extrusió de fàrmacs i sobre l'activitat fosfatasa alcalina. Per avaluar el potencial que podria tenir la curcumina en casos específics de LLC, s'han utilitzat cultius primaris per estudiar l'efecte de combinar-la amb diferents fàrmacs utilitzats en el tractament d'aquesta malaltia. Els cultius primaris també s'han utilitzat per analitzar els efectes sobre l'activitat de les caspases.

Caracterització de les línies cel·lulars

Encara que la majoria d'informació sobre les diferents línies cel·lulars de LLC utilitzades es poden trobar al PubMed i a la base de dades de la DSMZ, es va realitzar una caracterització exhaustiva d'aquestes línies per confirmar-ne l'expressió dels marcadors CD19 i CD5, de gran rellevància per a la detecció de les cèl·lules de la LLC; de CD38, important indicador pronòstic; i el perfil de cicle cel·lular.

Totes tres línies cel·lulars expressaven CD38 i CD19, en consonància amb el que hi ha descrit a les bases de dades^{184,185,191}. La proteïna CD38 actua promovent la supervivència i proliferació en les cèl·lules leucèmiques de la LLC³⁰, i la seva expressió confereix un pitjor pronòstic^{4,18,20}, amb taxes de resposta menors, un temps del diagnòstic a la primera teràpia més curt i una supervivència global menor³⁰. En tractar-se de línies cel·lulars, no té sentit buscar un significat clínic a l'expressió d'aquest marcador, però sí que pot ser rellevant per entendre l'elevada supervivència i proliferació de les línies cel·lulars estudiades. Pel que fa al CD19, és un marcador propi de cèl·lules B, que és utilitzat per a la detecció de les cèl·lules de la LLC, que normalment el coexpressen amb CD5^{1,10}.

Segons les dades immunofenotípiques obtingudes en aquesta Tesi Doctoral, les cèl·lules de la línia cel·lular I83 expressen CD5. En canvi, es va observar que les cèl·lules de la línia Mec1 eren negatives per aquest marcador, en consonància amb el que hi havia prèviament descrit^{185,186}. Les cèl·lules EHEB tampoc expressaven CD5, tot i que d'aquesta línia no es va trobar cap referència prèvia sobre l'expressió d'aquest marcador. Tot i que les cèl·lules dels pacients amb LLC normalment són positives per CD5, és freqüent que les línies immortalitzades tendixin a disminuir l'expressió d'aquest marcador amb el temps^{194,195}.

Pel que fa al contingut genètic, la línia Mec1 ha estat descrita com a quasidiploide^{185,186}, en canvi, en l'estudi del cicle cel·lular realitzat, es va determinar que les Mec1 utilitzades eren tetraploides o quasitetraploides. S'ha descrit que les cèl·lules d'aquesta línia presenten moltes anomalies

citogenètiques i diferències entre cèl·lules dins de la mateixa línia. De fet, està descrit que un 10% de les cèl·lules seria poliploide¹⁸⁷. El fet que, a més, algunes cèl·lules presentin adherència, podria haver afavorit una certa selecció d'una part de la població, que s'hauria enriquit en el fenotip poliploide.

Pel que fa al subcultiu diploide de I83, com s'ha comentat prèviament, es va obtenir a partir d'una dilució límit de la població tetraploide original. Aquest fenomen no es va poder replicar en dilucions posteriors, el que porta a pensar que aquesta població és molt minoritària, que la seva selecció hauria estat aleatòria i que la seva expansió es podria haver vist afavorida per les condicions de la dilució límit, com poden ser la baixa concentració cel·lular i l'estrès derivat de la manipulació. En condicions estables, en canvi, les cèl·lules tetraploides presentarien una major proliferació i acabarien sent majoritàries. Una hipòtesi que es deriva d'aquesta observació és que les I83 podrien mantenir una subpoblació diploide molt minoritària, gairebé indetectable, però que en certes circumstàncies es podria veure afavorida selectivament. El fet que una població en percentatges tan baixos es pugui mantenir, fa pensar que hauria de tenir una funció bàsica per la línia cel·lular, i es planteja com un model potencial de cèl·lules mare de LLC, molt minoritàries però capaces de regenerar la malaltia i tota una progènie de cèl·lules tetraploides.

D'altra banda, aquests resultats podrien ser un model que reflectís la progressió de la malaltia. La tetraploidització de les cèl·lules del cultiu uniformement diploide es va observar en dues ocasions i cultius independents. Aquest podria ser un mecanisme que conferiria major resistència i taxes de proliferació majors, tal i com passa en alguns pacients amb LLC a mida que la malaltia progressa. El fet que aquest fenomen s'hagi produït dues vegades de forma independent, partint d'una població uniformement diploide, faria pensar que les cèl·lules de la LLC són propenses a l'acumulació d'unes mutacions específiques, que determinarien una jerarquització de l'evolució clonal. Així doncs, tot i ser aparentment menys aberrants, les cèl·lules diploides podrien ser l'origen clonal de la malaltia i el romanent que, després de tractaments que generen una aparent remissió completa, causaria la progressió de nou cap a fenotips més aberrants, que són els que acaben generant les cèl·lules majoritàries de la leucèmia⁵¹.

Anàlisi de l'efecte sinèrgic de la curcumina

Considerant les característiques descrites de les línies cel·lulars i tot el que s'ha comentat prèviament sobre la LLC i la curcumina, cal fer èmfasi en la determinació del potencial sinèrgic de la curcumina com el principal objectiu de la present Tesi Doctoral. Utilitzant les tres línies cel·lulars de LLC descrites i cultius primaris derivats de mostres de sang perifèrica de diferents pacients de LLC, s'ha pogut demostrar el potencial efecte sinèrgic que podia generar la curcumina en combinació amb diferents fàrmacs. A nivell general, està ben descrit que la curcumina pot potenciar l'efecte d'alguns fàrmacs^{75,152,153,196-199}, i també apunten en aquest sentit els diferents resultats obtinguts en aquesta Tesi, el que podria permetre el disseny d'assaigs clínics futurs per tal de reduir les dosis de tractament dels pacients.

En les línies cel·lulars estudiades, la curcumina va produir una disrupció lleu de la membrana cel·lular i un bloqueig considerable de la proliferació. Això indicaria que la curcumina té un efecte important per sí sola sobre les cèl·lules leucèmiques, fet que coincideix amb estudis previs realitzats per altres grups^{61,79,80,200,201}. En cultius primaris, l'efecte observat va ser més moderat, en part per la major heterogeneïtat de les mostres, però també perquè es va valorar l'efecte selectiu de la curcumina sobre les cèl·lules leucèmiques, en comptes de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular total de les mostres, com s'havia fet amb els models cel·lulars de LLC. Així, en cultius primaris, a més de l'efecte citotòxic de la curcumina, es va valorar que aquest fos menor en les cèl·lules no leucèmiques de la mostra. D'altra banda, les línies cel·lulars utilitzades, a diferència de les cèl·lules leucèmiques dels cultius primaris, estan immortalitzades mitjançant infecció per EBV, i amb el cultiu estan sotmeses a una certa pressió de selecció, que podria afavorir les cèl·lules més resistents i amb unes taxes de proliferació majors. En actuar inhibint diversos mecanismes implicats en el metabolisme del càncer, l'efecte de la curcumina és molt notable en aquestes cèl·lules, més que quan s'aplica a cèl·lules amb unes taxes de proliferació més reduïdes. Tot i això, els experiments amb les línies cel·lulars són molt útils perquè serveixen com un model ideal, que permet veure de forma evident el potencial d'acció de la curcumina.

En les línies cel·lulars, la curcumina va potenciar, en major o menor mesura, l'efecte de tots els fàrmacs amb què es va combinar. Com a efectes més evidents que es van observar, destaca en primer lloc l'efecte sinèrgic que la curcumina va exercir sobre la colquicina en les Mec1, incrementant dràsticament la disrupció de la membrana cel·lular i aturant quasi completament la proliferació. Com s'ha comentat a la *Introducció*, la colquicina és un fàrmac que ha estat estudiat com a potencial tractament del càncer, encara que amb limitacions importants, com són l'estret marge terapèutic, a causa de la seva elevada toxicitat, o la incapacitat per generar remissions completes prolongades¹⁷⁰⁻¹⁷³. Cal remarcar que amb el banc de concentracions inicial que es va realitzar per escollir la dosi de colquicina més adequada pels experiments, es va observar que per sota de la concentració 0,005 µM no s'observava pràcticament cap efecte, mentre que per sobre d'aquesta concentració es produïa un efecte molt potent. Tenint en compte aquest inici abrupte de toxicitat que en limita l'ús terapèutic, la curcumina es presenta com una opció molt prometedora per complementar aquest fàrmac en certs casos, permetent assolir efecte amb dosis més baixes, augmentant el marge terapèutic i amb potencial per produir un sinergisme molt elevat. Alhora, en augmentar les taxes d'apoptosi, la curcumina podria afavorir l'assoliment d'unes remissions més completes i duradores. Val la pena remarcar que en les línies I83 i EHEB, l'efecte de la combinació va ser més moderat, i de caràcter additiu, fet que indicaria que aquest efecte sinèrgic podria estar restringit només a certs pacients.

Fins on coneixem, aquest és el primer estudi sobre l'efecte sinèrgic de la curcumina amb la colquicina en un model cel·lular de leucèmia. Tot i això,

existeixen articles previs sobre l'efecte de la combinació d'aquests dos compostos. En un estudi realitzat sobre *Plasmodium falciparum*, es va observar que la curcumina tenia un efecte antagonista amb la colquicina a l'hora d'inhibir la proliferació del protozou paràsit²⁰². La raó podria ser que, com apunten altres investigadors, tots dos compostos comparteixen un mateix mecanisme d'acció, unint-se a la tubulina i desestabilitzant els microtúbuls, fet que generaria una certa competició²⁰²⁻²⁰⁴. Així doncs, els estudis previs no apuntarien cap a l'efecte de potenciació observat en aquesta Tesi, fet que es podria explicar per la gran distància a nivell de subjecte (protozou²⁰² vs. cèl·lules humanes) o de metodologia (assaig competitiu d'unió²⁰³ o *molecular docking in silico*²⁰⁴ vs. assaig de viabilitat *in vitro*). Malgrat que els dos compostos puguin tenir un efecte antagònic pel que fa a la disrupció de microtúbuls, la curcumina podria potenciar la colquicina en afectar moltes altres vies de gran rellevància en la leucèmia i en les quals la colquicina no intervé.

Cal remarcar que la colquicina interactua amb el complex enzimàtic hepàtic CYP3A4, també conegut com a citocrom P450, central en el metabolisme de molts fàrmacs. La colquicina seria metabolitzada per aquest complex, i alhora actuaria inhibint-lo^{167,168,174}. La curcumina també afecta aquest mateix complex⁸⁸, el que *in vivo* pot reduir les taxes d'eliminació d'altres compostos metabolitzats per aquest mecanisme, com pot ser la colquicina. D'altra banda, la colquicina també interactua amb la glicoproteïna P, la qual sembla que estaria implicada en la seva eliminació via excreció biliar^{167,168}. De fet, està descrit que la combinació de la colquicina amb altres compostos que també afectin l'activitat de la glicoproteïna P, com és el cas dels macròlids, pot provocar una pancitopènia greu¹⁶⁷. La curcumina ha estat descrita com a inhibidora d'aquest transportador^{103,105,106}, de manera que podria afectar a la biodisponibilitat de la colquicina a nivell d'organisme i alhora, a nivell cel·lular, podria ser una de les causes del sinergisme observat en aquesta Tesi Doctoral. Així, sembla raonable que la curcumina pugui reduir les taxes d'eliminació de la colquicina i augmentar-ne les concentracions plasmàtiques *in vivo*. Tenint en compte l'elevada toxicitat que pot assolir la colquicina, qualsevol combinació de la curcumina amb aquest fàrmac hauria d'anar acompanyada d'un estudi farmacològic detallat, amb els ajustaments de dosi que es poguessin requerir i amb especial atenció a possibles efectes de toxicitat.

Pel que fa al tractament amb fludarabina, la combinació amb la curcumina va tenir un efecte potenciador moderadament sinèrgic en les Mec1, i clarament superior que en les I83. La fludarabina tenia un efecte força limitat en les Mec1, i és interessant recordar que les cèl·lules d'aquesta línia tenen una mutació en *TP53* que redueix la sensibilitat a l'apoptosi i els confereix resistència a aquest fàrmac^{188,189}. Així, els resultats obtinguts en aquesta Tesi semblen corroborar aquest fet, i sembla que la curcumina tindria la capacitat de revertir en part aquesta quimioresistència. Malgrat que aquest resultat s'ha obtingut en models cel·lulars, cal remarcar la rellevància clínica que pot tenir, ja que la fludarabina és el principal fàrmac que s'utilitza en el tractament de la LLC, i de fet, la

resistència que presenten a aquest compost els pacients amb mutació de *TP53* o deleció de 17p és determinant en el pitjor pronòstic que presenten i en la necessitat de buscar alternatives de tractament. L'anàlisi de l'efecte de la curcumina sobre cultius primaris derivats de mostres de pacients de LLC amb *TP53* mutat o deleció de 17p requereix més investigació mitjançant estudis addicionals, fet que no ha estat possible en aquesta Tesi a causa del reduït nombre de mostres de pacients amb aquesta mutació.

Com a apunt, les cèl·lules EHEB estan descrites com una línia que no presenta mutacions de *TP53* ni delecions de 17p^{191,205,206}. No obstant, les cèl·lules d'aquesta línia van mostrar poca sensibilitat al tractament amb fludarabina, i com en les Mec1, la combinació amb curcumina va augmentar lleugerament l'efecte. Aquesta baixa sensibilitat podria ser causada per altres mecanismes, que també podrien ser parcialment revertits per la curcumina²⁰⁷⁻²¹⁰.

Pel que fa a l'etopòsid, la curcumina en va potenciar l'efecte en totes tres línies cel·lulars, tant pel que fa a la citotoxicitat com al bloqueig de la proliferació cel·lular. La major potenciació es va produir en les Mec1, en què l'etopòsid i la curcumina no produïen efecte per separat sobre la viabilitat cel·lular. En canvi, la combinació va produir una reducció important en el percentatge de cèl·lules negatives per PI. Tot i que hi ha alguns estudis en què es descriu un efecte antagònic entre la curcumina i l'etopòsid en línies cel·lulars de diferents tipus de càncer^{211,212}, els resultats obtinguts en aquesta Tesi coincideixen amb els de la majoria d'estudis previs, que descriuen que la curcumina potencia l'etopòsid o augmenta la sensibilitat de les cèl·lules de diferents tipus de càncer a aquest fàrmac^{213,214} per mitjà de diferents mecanismes, com poden ser la inhibició de NFκB i AP-1^{75,215}, la inhibició de la MDR^{112,114}, la inhibició de l'activitat del glutatió²¹⁶, la inducció de ROS¹⁵², o la generació de danys en el DNA i el bloqueig del cycle cel·lular²¹⁷. Menys relacionat amb la metodologia utilitzada en aquesta Tesi, però rellevant des d'un punt de vista clínic, s'ha observat *in vivo*, amb experiments realitzats amb rates, que la curcumina augmenta la biodisponibilitat de l'etopòsid en inhibir el CYP3A i la P-gp¹⁰⁵, i també que redueix els danys produïts per aquest fàrmac en els precursors mieloides no leucèmics²¹⁸.

Pel que fa a la combinació amb camptotecina, la curcumina també va produir un efecte potenciador important, en aquest cas, lleugerament més notable en les I83 que en les Mec1. En la línia EHEB, en canvi, no es va produir potenciació. Ha estat prèviament descrit que la curcumina té un efecte sinèrgic sobre derivats de la camptotecina, en inhibir la MDR^{111,199,219}. En aquest sentit, és important remarcar que la línia I83, en què s'ha vist més incrementada la toxicitat de la camptotecina amb la combinació amb curcumina, també va ser la línia que presentava uns nivells d'extrusió de fàrmacs més elevats i en què la curcumina produïa una major inhibició d'aquest mecanisme. Així, els resultats observats en les I83 es podrien atribuir, almenys en part, a la inhibició de l'extrusió de la camptotecina.

S'ha descrit que la curcumina també potencia l'efecte antitumoral de la camptotecina o els seus derivats per altres vies, com són la generació d'estrès del reticle endoplasmàtic i de ROS¹⁵³, la generació de dany en el DNA²²⁰, o la inhibició de NFκB i AP-1⁷⁵. A més, hi ha diversos assaigs en què s'avalua l'efecte combinat de la curcumina i la camptotecina en formulacions que augmenten la biodisponibilitat i selectivitat dels dos compostos, amb resultats positius^{162,221,222}. Per contra, s'ha trobat només un únic article en què es descriu que la curcumina va reduir l'apoptosi induïda per la camptotecina, en models cel·lulars de càncer de mama *in vitro* i *in vivo*²²³. D'altra banda, referent a cèl·lules no leucèmiques, alguns estudis han descrit que la combinació de la curcumina amb l'irinotecan podria reduir la toxicitat produïda pel fàrmac en l'organisme, en reduir el dany tissular produït en el cor^{224,225} i la mucosa intestinal¹⁶⁴ gràcies al seu efecte antioxidant i antiinflamatori.

Finalment, pel que fa a la citarabina, va ser el fàrmac menys potenciat en combinació amb la curcumina. Malgrat que no s'utilitza actualment en el tractament de la LLC, sí que hi ha estudis que indiquen que la citarabina podria ser útil en combinació amb altres fàrmacs per al tractament de la LLC en recaiguda, prèviament tractada, refractària o en transformació de Richter¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. En els estudis realitzats en aquesta Tesi no es va observar que la citarabina 0,01 μM tingués pràcticament efecte sobre la viabilitat cel·lular, però sí que va produir un cert bloqueig de la proliferació, relativament important en I83 i moderat en Mec1 i EHEB. Així doncs, en general la citarabina va tenir un efecte de baixa toxicitat, fet que corroboraria que la seva potencial utilització en el tractament de la LLC hauria de ser en combinació amb altres fàrmacs.

Pel que fa a la seva combinació amb la curcumina, es va observar que no produïa cap canvi important en la viabilitat cel·lular, i només va incrementar lleument el bloqueig de la proliferació produït en les Mec1. Hi ha pocs estudis previs que permetin contrastar aquests resultats. En dos d'ells, un realitzat amb les línies cel·lulars de leucèmia K-562 i HL-60 i un altre amb cèl·lules de moll d'os de pacients amb leucèmia aguda mieloide, es va observar que la curcumina tenia un efecte sinèrgic en combinació amb la citarabina^{196,197}. En un altre estudi, realitzat amb la línia cel·lular de leucèmia aguda limfoblàstica REH, es va observar que la curcumina també tenia un efecte sinèrgic amb la citarabina reduint l'activació de NFκB, tot i que l'efecte sobre la viabilitat cel·lular no va ser significatiu¹⁹⁸. Així doncs, amb els resultats obtinguts no es pot determinar que la curcumina pugui tenir un efecte potenciador sobre la citarabina en la LLC, i és possible que aquest efecte depengui del tipus de càncer o leucèmia estudiat.

Amb el mateix objectiu d'estudiar el potencial sinèrgic de la curcumina, una vegada avaluat el seu efecte sobre línies cel·lulars, es va procedir a estudiar-ne l'efecte sobre diferents fàrmacs utilitzats en el tractament de la LLC, utilitzant, en aquest cas, cultius primaris derivats de mostres de sang perifèrica de pacients amb LLC. En les anàlisis de cultius primaris s'observa una gran variabilitat dels diferents paràmetres estudiats, a causa que les mostres provenen de diversos pacients, amb característiques clíniques molt diferents. Aquesta elevada variabilitat no ha impedit que s'obtinguin resultats significatius. Estadísticament

s'han realitzat algunes transformacions de les dades amb l'objectiu de reduir la variabilitat basal, com ara la normalització dels resultats a partir dels controls, sense que aquestes transformacions hagin influït en la significança dels resultats.

La combinació de la curcumina amb la fludarabina no va produir un efecte sinèrgic significatiu en la reducció de les cèl·lules leucèmiques. Aquest resultat coincideix amb l'obtingut prèviament amb les línies cel·lulars estudiades en aquesta Tesi, en què la curcumina va tenir un efecte potenciador de la fludarabina moderat. L'efecte sinèrgic més important es va produir en les Mec1, que presenten una mutació de *TP53* que augmenta la resistència a la fludarabina i que seria parcialment revertida amb la combinació amb la curcumina. En l'estudi amb cultius primaris cap de les mostres tractades amb fludarabina presentava mutacions detectables de *TP53*. Només s'ha trobat una referència prèvia en la bibliografia en què s'estudiés l'efecte combinat de la curcumina i la fludarabina. Els resultats d'aquest estudi coincideixen amb els d'aquesta Tesi Doctoral, ja que es va observar que la combinació de curcumina 1 μ M amb fludarabina 1 μ M no produïa un augment significatiu de l'apoptosi en cèl·lules B de LLC aïllades de mostres de sang perifèrica⁹⁰. Tenint en compte la rellevància clínica de la resistència a la fludarabina, els resultats positius obtinguts amb les Mec1 i el reduït nombre d'estudis previs en què s'estudiï la combinació de la curcumina i la fludarabina, seria molt interessant poder avaluar en futurs assaigs l'efecte sinèrgic de la curcumina amb la fludarabina en mostres de pacients amb *TP53* mutada o amb deleció de 17p.

Pel que fa a l'ibrutinib, va tenir un efecte molt potent en l'eliminació de les cèl·lules leucèmiques, però no es va observar potenciació d'aquest efecte amb la combinació amb curcumina. Això es pot atribuir al reduït nombre de mostres ($n = 8$) i a que, pel fet de tractar-se de recaigudes, els nivells basals de cèl·lules leucèmiques d'aquestes mostres eren relativament baixos. A més, l'ibrutinib per sí sol ja presentava un efecte citotòxic important, disminuint encara més els nivells de cèl·lules de LLC i deixant un marge estret per produir més efecte a la combinació amb la curcumina. Un fet que dona suport a aquesta hipòtesi és que la curcumina per sí sola sí que va produir una reducció important i significativa del percentatge de cèl·lules leucèmiques en aquestes mostres, però aquest efecte no s'observava en combinació amb l'ibrutinib, ni tan sols com a efecte additiu. Sí que es va observar, en canvi, que la curcumina potenciava l'eliminació de cèl·lules leucèmiques produïda per l'ibrutinib en un dels pacients estudiats, del qual se'n van obtenir mostres en quatre ocasions diferents durant el seguiment. Aquest pacient tenia com a factors de risc una deleció de 11q, que afectava el gen *ATM*, i positivitat per ZAP-70. A més, presentava deleció de 13q. Tot i que la curcumina va mostrar un efecte sinèrgic en aquestes mostres, aquest no va ser significatiu, un fet que podria estar relacionat amb la baixa mida mostral, i que per tant requereix més investigació.

D'altra banda, la curcumina sí que va tenir un efecte sinèrgic molt important en la reducció del percentatge de cèl·lules positives per ALP que produïa l'ibrutinib. La fosfatasa alcalina és un enzim ubic en l'organisme, que en condicions d'alcalinitat hidrolitza molècules que contenen fosfat. Tot i que la seva funció encara no es coneix amb exactitud, sembla que estaria relacionada amb regeneració, proliferació i activitat cel·lular. Hi ha quatre formes conegudes de la fosfatasa alcalina, la intestinal, la placentària, la placentària-*like* i la no específica de teixit²²⁶. Les concentracions sanguínies o sèriques de fosfatasa alcalina són un valor analític àmpliament utilitzat. Corresponen bàsicament a la forma no específica de teixit, que és produïda sobretot per fetge, ossos i ronyons, de manera que permet detectar possibles augments d'activitat en aquests òrgans que poden indicar diferents malalties i processos, com ara hepatitis, obstrucció biliar, regeneració de l'os, tumors ossis, malaltia de Paget i raquitisme, entre d'altres. A nivell cel·lular es coneix que la fosfatasa alcalina s'expressa en nivells elevats en les cèl·lules mare pluripotents. Així, la major activitat fosfatasa alcalina estaria associada a un major grau d'immaduresa i pluripotència²²⁷, de manera que ha estat utilitzada per distingir diferents subpoblacions de cèl·lules mare^{226,228}. En aquesta Tesi s'ha utilitzat un protocol de marcatge per detectar l'activitat ALP en cèl·lules vives mitjançant citometria de flux, desenvolupat prèviament pel nostre grup de recerca^{56,57}, a fi d'identificar subpoblacions de cèl·lules mare leucèmiques. L'efecte sinèrgic de la curcumina amb l'ibrutinib en l'eliminació de cèl·lules leucèmiques positives per ALP podria tenir implicació a més llarg termini, facilitant l'eliminació de les cèl·lules leucèmiques més refractàries i permetent assolir remissions més prolongades i completes. Fins on coneixem, aquest és el primer estudi en què s'avalua l'efecte de combinar curcumina i ibrutinib, i els resultats obtinguts semblen recolzar l'interès de realitzar més estudis analitzant l'efecte combinatori d'aquests dos compostos, especialment en la LLC.

Com s'ha comentat prèviament, en el subgrup de mostres tractades amb ibrutinib, l'administració únicament de curcumina ja va demostrar un efecte selectiu en l'eliminació de la fracció leucèmica, a diferència del que s'havia observat sobre les mostres tractades amb fludarabina. Aquestes diferències de resposta al mateix compost podrien respondre a la diferent naturalesa de les mostres estudiades, ja que mentre moltes de les mostres tractades amb fludarabina corresponien a pacients en tractament de primera línia, la majoria de pacients tractats amb ibrutinib estaven en recaiguda i se'ls administrava tractament de segona línia o més. La diferent naturalesa de les mostres és corroborada pels valors basals obtinguts per ambdós grups. Les mostres tractades amb ibrutinib presentaven uns percentatges més baixos de cèl·lules leucèmiques, amb una elevada positivitat per ALP, el que indicaria que s'hauria produït una selecció de les cèl·lules més refractàries com a conseqüència dels tractaments rebuts pels pacients. Els resultats obtinguts indiquen que la curcumina podria ser especialment efectiva per eliminar les cèl·lules leucèmiques més refractàries.

Pel que fa al rituximab, no es va detectar que produís cap efecte sobre les cèl·lules leucèmiques ni sobre la viabilitat dels cultius, i només en un únic cas va reduir els nivells d'ALP. Malgrat la reduïda mida mostral ($n = 5$), els resultats són força uniformes i consistents. Així, els resultats apunten a que el rituximab no tindria efecte sobre els cultius primaris de LLC en el període de temps estudiat, malgrat ser un fàrmac utilitzat en els tractaments. Tot i que el rituximab indueix apoptosi en les cèl·lules B, està descrit que té un paper molt important en el seu efecte la lisi mediada per complement^{181,182}. És possible que aquest mecanisme sigui indispensable en la LLC, potser perquè les cèl·lules d'aquesta leucèmia, precisament, tenen reduïts els mecanismes d'entrada en apoptosi. Aquesta podria ser una explicació a la manca d'efecte del rituximab, ja que aquests experiments es van realitzar *in vitro* i després de realitzar un procediment de rentat cel·lular. De fet, aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per *Kamburova et al.*, que van observar que el rituximab aturava la proliferació de les cèl·lules B *in vitro*, però només es produïa mort cel·lular quan s'afegia complement¹⁸¹.

La curcumina no va produir més efecte de citotoxicitat en combinació amb el rituximab que aquell que produïa la curcumina per sí sola. L'estudi d'aquesta combinació podria ser de gran interès, sent indispensable optimitzar abans la metodologia per tal d'evidenciar si el rituximab produeix efectes detectables en les cèl·lules. Els canvis metodològics relacionats amb aquesta finalitat podrien passar per l'addició de complement o la modificació d'algunes condicions del cultiu primari per tal de mantenir més la similitud amb el microambient de les cèl·lules en l'organisme. No s'han trobat estudis previs en què s'avaluï la combinació de curcumina i rituximab.

Malauradament, com a conseqüència del reduït nombre de mostres de pacients susceptibles de ser tractades amb venetoclax segons els criteris establerts, no s'ha pogut estudiar l'efecte d'aquest fàrmac en combinació amb la curcumina en cultius primaris. No s'ha trobat cap article on s'hagués estudiat prèviament l'efecte de combinar el venetoclax amb la curcumina, de manera que aquest podria ser un estudi de gran interès per realitzar posteriorment. Els resultats obtinguts amb la línia I83 indiquen que la curcumina podria tenir un efecte potenciador important sobre el venetoclax, si bé cal tenir en compte que les dosis tòxiques del fàrmac varien considerablement entre línies cel·lulars i cultius primaris, de manera que els resultats obtinguts podrien no ser extrapolables.

La fludarabina 10 μM i el venetoclax 100 nM van generar una citotoxicitat elevada en els controls negatius obtinguts a partir de mostres de sang perifèrica d'individus sense LLC ni altres malalties hematològiques conegudes. L'ibrutinib 10 μM i la fludarabina 1 μM van presentar certa toxicitat, tot i que força menor. La curcumina va tenir per sí sola un efecte de toxicitat molt baix, tant en els controls sans com en les cèl·lules no leucèmiques de les mostres obtingudes de pacients. Aquest fet és coherent amb la baixa toxicitat descrita en altres estudis^{88,125,156,157}. La combinació amb curcumina de la fludarabina i el venetoclax va augmentar moderadament la citotoxicitat, fet que indicaria que l'administració de curcumina combinada amb aquests fàrmacs no hauria de

produir problemes més importants de toxicitat. Tot i això, cal recordar que la curcumina pot tenir efecte sobre enzims de detoxificació hepàtics, el que podria implicar efectes adversos no observables en els experiments *in vitro*.

La combinació de la curcumina amb l'ibrutinib sí que va augmentar considerablement la toxicitat produïda per aquest fàrmac en les cèl·lules no leucèmiques. Aquesta combinació també havia tingut un important efecte sobre les cèl·lules leucèmiques amb una major activitat ALP. Aquests resultats indiquen que la combinació dels dos compostos té un efecte sinèrgic important, i alhora, que podria generar toxicitat també en les cèl·lules no leucèmiques. Cal remarcar la dificultat per assolir uns nivells elevats i sostinguts de curcumina en sang, a causa de la seva baixa biodisponibilitat. Si es considera el consum quotidià de cúrcuma, que no sol tenir un contingut de curcumina superior al 5% i no es presenta en una formulació que n'augmenti la biodisponibilitat, sembla improbable que es pugui produir toxicitat en pacients que rebin tractament amb ibrutinib com a conseqüència del consum de cúrcuma o complements alimentaris de curcumina. Considerant un potencial ús terapèutic, però, caldria tenir en compte aquests resultats, i realitzar els estudis *in vivo* necessaris per determinar els efectes que aquesta combinació pogués produir si s'utilitzessin formulacions o vies d'administració que augmentessin la biodisponibilitat de la curcumina. No s'ha trobat cap article en què s'estudiï l'efecte combinatori de la curcumina i l'ibrutinib, el que confirma la novetat d'aquests experiments i evidencia la necessitat de realitzar més estudis en aquesta mateixa línia. Tenint en compte l'important efecte de la curcumina sobre l'ibrutinib reduint les cèl·lules leucèmiques amb major activitat ALP, caldrà valorar en propers estudis fins a quin punt aquesta combinació podria permetre l'administració de dosis més baixes de fàrmac que compensessin la toxicitat produïda en cèl·lules no leucèmiques.

Pel que fa a l'estudi dels factors de risc, s'ha observat que les mostres obtingudes de pacients amb algun factor de risc advers tenien, de mitjana, percentatges lleugerament més baixos de cèl·lules leucèmiques que les de pacients que no tenien factors de risc adversos, mentre que tenien percentatges lleugerament incrementats de cèl·lules leucèmiques amb una elevada activitat ALP. Aquesta diferència podria estar relacionada amb el fet que els pacients amb factors de risc advers tenen més probabilitat d'haver estat tractats, el que implica que els nivells de cèl·lules leucèmiques siguin lleugerament menors, alhora que produeix un enriquiment d'aquelles cèl·lules leucèmiques amb una major activitat ALP. Aquest mateix fenomen es va observar quan es van analitzar específicament les mostres de pacients amb deleció de 11q.

La resposta a fàrmacs de la fracció leucèmica va ser lleugerament superior en les mostres de pacients que presentaven factors de risc advers que en les d'aquells pacients que no en presentaven, i també va resultar superior l'efecte de la combinació amb curcumina. Aquests resultats no coincideixen amb el que seria esperable, atès que les cèl·lules derivades de pacients amb factors de risc generalment són més resistents als tractaments. Aquesta observació es pot atribuir a la baixa mida mostral, juntament amb el fet que es comparen fàrmacs

diferents i que moltes de les mostres provinents de pacients amb factors de risc advers van ser tractades amb ibrutinib (el 50%), el qual generava uns nivells de resposta superiors a la fludarabina. Pel que fa al major efecte potenciador de la curcumina, podria ser causat per un sinergisme de major ordre en aquelles mostres obtingudes de pacients que presenten mecanismes de resistència a fàrmacs. Cal destacar que aquests resultats no han estat significatius en cap cas, i s'ha de considerar que no permeten extreure cap conclusió referent a la influència dels factors de risc de la LLC.

Com a resum d'aquest apartat, la curcumina demostra potencial per augmentar l'efecte citotòxic d'alguns dels fàrmacs estudiats i alhora revertir parcialment la quimioresistència, el que podria permetre plantejar estratègies terapèutiques dirigides a reduir les dosis, la toxicitat, i per tant prolongar els tractaments, contribuint a retardar la progressió de la malaltia. La curcumina podria ser útil tant per impedir o retardar l'aparició de resistències com per recuperar el tractament de primera línia en pacients recaiguts, suposant una millora en la qualitat de vida dels pacients i afavorint una reducció dels efectes adversos en la seva salut, que poden acabar limitant a mitjà termini el tractament òptim de la malaltia.

Malgrat la baixa biodisponibilitat de la curcumina, que dificulta assolir dosis terapèutiques *in vivo*, el seu efecte selectiu la fa un compost amb potencial per millorar el tractament de la LLC, així com d'altres càncers. Aquesta limitació es pot revertir en part amb millores en la formulació que optimitzin la biodisponibilitat. Com majors i més prolongats siguin els nivells de curcumina en plasma assolits, major serà l'efecte que aquesta pugui produir.

Qualsevol tractament terapèutic experimental que es pogués implementar utilitzant la curcumina hauria d'anar acompanyat d'un seguiment clínic i dels estudis farmacològics pertinents. Malgrat que no s'han trobat estudis que hagin descrit interaccions adverses importants de la curcumina amb altres compostos, sí que està descrit que pot interactuar amb enzims hepàtics implicats en el metabolisme de fàrmacs, el que podria modificar-ne la biodisponibilitat^{88,105}. Això, juntament amb els efectes pleiotròpics propis de la curcumina, fa pensar que la seva administració podria produir certs canvis, sobretot en el metabolisme i l'eliminació dels fàrmacs, que poguessin requerir ajustaments en les dosis, així com un seguiment dels possibles efectes adversos que es poguessin produir.

Estudi de l'efecte de la curcumina sobre l'activitat ALP

A fi d'estudiar amb major profunditat els possibles efectes de la curcumina sobre l'activitat fosfatasa alcalina, es van realitzar experiments addicionals utilitzant els models cel·lulars de LLC ja descrits i avaluant l'efecte de diferents concentracions de curcumina. La curcumina va demostrar un efecte modulador de l'activitat fosfatasa alcalina, que va variar en funció de la dosi de curcumina i el model cel·lular estudiat, amb una tendència a disminuir-ne l'activitat en les I83

i les Mec1. Tot i això, a dosis baixes la curcumina va augmentar lleument l'activitat de l'enzim, el que fa pensar que podria tractar-se d'un efecte hormètic, en què les dosis elevades fan disminuir l'activitat mentre que les dosis baixes no assoleixen prou efecte i alhora estimulen les cèl·lules i augmenten l'activitat enzimàtica. Així, caldria tenir en compte que si *in vivo* no es poden assolir unes concentracions mínimes de curcumina a nivell plasmàtic, l'efecte sobre aquest paràmetre podria ser nul o fins i tot antagonista. D'altra banda, en les EHEB es va produir l'efecte contrari que en les I83 i les Mec1, i dosis majors de curcumina van augmentar en major mesura l'activitat de la fosfatasa alcalina. Una possible causa d'aquesta diferència podria ser el metabolisme cel·lular reduït de les EHEB en comparació amb el de les altres dues línies, de manera que en aquest cas, la curcumina no produiria tant d'estrès metabòlic i alhora suposaria un estímul que incrementaria l'activitat metabòlica cel·lular, traduint-se en aquest increment de l'activitat ALP. Aquest efecte no ha de ser necessàriament deleteri, ja que la disminució del metabolisme cap a una relativa quiescència és una estratègia de resistència d'algunes cèl·lules leucèmiques, que d'aquesta manera no es veuen afectades pels tractaments.

Cal recordar que, encara que s'hagi utilitzat per detectar cèl·lules mare leucèmiques, la fosfatasa alcalina és un enzim present en una gran varietat de tipus cel·lulars i implicat en molts processos metabòlics. La complexitat dels efectes observats en els nivells d'activitat de l'ALP podria respondre a variacions del metabolisme cel·lular, i és possible que s'hagi d'entendre com la conseqüència de múltiples canvis cel·lulars que pot estar produint la curcumina, més que com l'inici d'una cascada o una diana a la qual afecti directament. Així, en les I83 i les Mec1, la curcumina produiria una reducció de l'activitat ALP en disminuir parcialment el metabolisme cel·lular, mentre que en les EHEB podria augmentar-la com a conseqüència de produir estrès cel·lular, al qual les cèl·lules respondrien amb un augment del metabolisme. Cal recordar que les EHEB són la línia estudiada amb menys signes de transformació maligna¹⁸⁶, un fet que podria explicar en part que la curcumina exercís un efecte diferent sobre aquest model.

L'efecte de la curcumina sobre l'activitat ALP va ser molt més evident en les cèl·lules leucèmiques dels cultius primaris. En la majoria dels casos, la curcumina va reduir el percentatge de cèl·lules amb activitat ALP incrementada. Aquest efecte podria ser important a l'hora de sensibilitzar les cèl·lules de la LLC als tractaments, sobretot aquelles més primitives o amb un fenotip de cèl·lula mare més refractari, i podria afavorir a llarg termini remissions completes o, si més no, més prolongades, fins i tot plantejant teràpies simultànies dirigides contra la fosfatasa alcalina. Des del punt de vista dels tractaments crònics, l'administració de la curcumina, individualment o en combinació amb determinats fàrmacs, podria suposar un règim nutricioncològic experimental de manteniment, amb pocs efectes adversos sobre els pacients, que permetés mantenir latents els possibles romanents de cèl·lules leucèmiques, permetent així mantenir una MMR baixa i retardant o evitant la progressió de la malaltia.

Les anàlisis de la fosfatasa alcalina realitzades en els cultius primaris s'han basat en el protocol prèviament descrit pel nostre grup de recerca per a la detecció de poblacions de cèl·lules leucèmiques primitives (*Rico et al. 2016*)⁵⁶, i utilitzat posteriorment en un estudi prospectiu amb mostres de pacients de leucèmia mieloide aguda⁵⁷. Malgrat que de moment no permeten extreure conclusions definitives, ja que el temps de seguiment ha estat massa curt, les anàlisis dels nivells d'activitat de la fosfatasa alcalina realitzades sobre el total de mostres de pacients de LLC (n = 52) poden ser de gran utilitat pel disseny d'un futur estudi prospectiu, una vegada s'hagi pogut estudiar la seva possible associació amb el curs clínic dels pacients.

Efectes de la curcumina sobre el cicle cel·lular

Pel que fa al cicle cel·lular, la curcumina va produir clarament un bloqueig de cèl·lules en la fase S. Aquest efecte pot ser a causa de la inhibició que exerceix la curcumina sobre diferents ciclins⁵⁸. Està descrit que la curcumina produeix bloqueig del cicle cel·lular, que s'ha pogut observar en diferents fases. Alguns articles descriuen que es produeix en fase G2M i/o G0G1^{61,62,229–231}, mentre que d'altres el situen entre les fases S²³², G1 i S^{86,233} o entre S i G2M^{200,234}. És possible que la fase del cicle cel·lular en què es produeix el bloqueig estigui determinada per múltiples factors, i que pugui variar en funció del tipus de càncer o leucèmia. En el cas de la LLC, sembla molt evident que el bloqueig es produeix en la fase S, ja que aquest resultat es va obtenir inequívocament per totes tres línies cel·lulars estudiades. Fins on coneixem, aquest és el primer estudi que descriu en quina fase del cicle cel·lular produeix bloqueig la curcumina en models de LLC.

Els fàrmacs estudiats van produir bloqueig en diferents fases del cicle cel·lular, i aquest efecte va ser diferencialment modulats amb la combinació amb la curcumina. L'etopòsid, per exemple, va produir bloqueig en fase G2M, i la curcumina va exercir un efecte aparentment antagonista en alguns casos, ja que en produir bloqueig en fase S, va disminuir el percentatge de cèl·lules bloquejades en fase G2M. Pel que fa a la camptotecina, va produir bloqueig igualment en fase G2M, i també en fase S. La colquicina va produir bloqueig tant en fase S com G2M, sent més important el bloqueig en fase S per les I83 i les EHEB, i en fase G2M per les Mec1. La citarabina i la fludarabina van produir bloqueig sobretot en fase S, i en algun cas, també en G2M. Aquests resultats indiquen que tots els fàrmacs testats afecten la progressió del cicle cel·lular, i que la curcumina, en alguns casos pot augmentar aquest bloqueig i en d'altres disminuir-lo, malgrat que aquesta modulació no sembla guardar especial relació amb l'efecte sinèrgic produït sobre la toxicitat.

Efectes de la curcumina sobre la citomorfologia

La curcumina i els fàrmacs estudiats van produir diferents efectes sobre la citomorfologia de les línies de LLC. Els efectes que es van observar amb més freqüència i de forma inequívoca van ser l'increment de mida de les cèl·lules i nuclis i la deformació d'aquests; la compactació de la cromatina i fragmentació del nucli; l'aparició de petites vesícules al citoplasma; la vacuolització; i la presència de cossos apoptòtics i cèl·lules en diferents fases de mort cel·lular. Hi ha altres efectes que no es van tenir en compte per no produir-se de forma tan evident, com són l'increment de la basofília, que podria dependre de petites variacions de la tinció en preparacions independents; o l'aparició de deformacions de la membrana cel·lular, que en cap cas van ser tan evidents com per poder assegurar que fos un efecte del tractament i no un artefacte.

En primer lloc, l'increment de mida de les cèl·lules i/o els nuclis, la deformació d'aquests i l'aparició de cèl·lules polinucleades són conseqüències d'un bloqueig del cycle cel·lular que impedeix la cariocinesi i/o la citocinesi. Pel que fa al segon efecte, la compactació de la cromatina i la fragmentació del nucli, podria ser una altra conseqüència del bloqueig del cycle, però en aquest cas, en comptes d'un increment de mida del nucli, es produiria la pèrdua de la seva integritat. Aquest efecte podria estar relacionat amb un bloqueig en fases més avançades del cycle cel·lular (metafase o anafase), en què la membrana nuclear es disgrega per facilitar la segregació dels cromosomes. Els fragments de cromatina observats presentaven un empaquetament semblant al dels cromosomes, tot i que semblaven més arrodonits i resulta més prudent parlar de fragments nuclears. Cal recordar que la disgregació de l'embolcall nuclear, la condensació de la cromatina i la seva fragmentació, són algunes de les característiques de les cèl·lules que entren en apoptosi²⁸, de manera que resulta difícil determinar si els efectes observats responen a un bloqueig del cycle o a una entrada en apoptosi, dos processos que, a més, estan estretament relacionats.

L'increment de mida dels nuclis i la presència de cèl·lules polinucleades es va observar sobretot en les I83, amb tots els tractaments excepte la colquicina, que va produir fragmentació nuclear en els tres models estudiats. En canvi, en les Mec1 va ser més freqüent la fragmentació del nucli, que es va produir amb tots els tractaments excepte l'etopòsid i la camptotecina. Així, pel que fa a les línies cel·lulars, les I83 tindrien més tendència a incrementar el material genètic mantenint la integritat del nucli, mentre que les Mec1 serien més susceptibles a fenòmens de compactació de la cromatina i fragmentació del nucli. Pel que fa a fàrmacs, sembla clar que l'etopòsid i la camptotecina produeixen un increment de la mida nuclear, ja que aquest efecte es va observar en totes tres línies. Així doncs, sembla que el bloqueig de les topoisomerases II i I respectivament generaria aquest efecte. L'explicació d'aquest fenomen seria que l'acció d'aquests fàrmacs es produeix sobretot en fase S i G2, en què s'acumulen trencaments i defectes en el DNA a causa de la inhibició d'aquests enzims^{158,161,163}. Tot i això, en tractar-se de cèl·lules leucèmiques, el cycle en molts casos progressa, encara que no sempre es pot completar i es produeix una acumulació de DNA sense que s'arribin a segregar els nuclis o les cèl·lules filles. La colquicina, en canvi, va produir fragmentació del nucli, ja que la inhibició de la polimerització de microtúbuls que indueix atura el cycle cel·lular en la

mitosi¹⁶⁷. Tot i produir bloqueig preferentment en fase S, la curcumina, la citarabina i la fludarabina no van ser tan específiques, i van produir acumulació de DNA i increment de mida del nucli en les I83, mentre que en les Mec1 van produir fragmentació del nucli, probablement com a conseqüència de l'entrada en apoptosi.

La formació de petites vesícules i la vacuolització no van ser tan específiques de fàrmac com de la línia cel·lular i del nivell d'afectació de les cèl·lules. La presència d'algunes vesícules s'observava en totes tres línies cel·lulars ja als controls. Determinats tractaments (camptotecina, fludarabina i, en menor mesura, etopòsid), en van augmentar el nombre dràsticament, sobretot en les I83. En les Mec1 i les EHEB s'observava la formació d'algunes vesícules amb els tractaments, però en molt menor nombre que en les I83. En canvi, la formació de vacúols d'una mida considerable es va produir només en les EHEB, amb tots els fàrmacs testats. Amb el tractament amb citarabina es va produir una certa vacuolització en les Mec1, tot i que els vacúols produïts eren de mida menor i menys abundants que els observats en les EHEB. Així, la formació de vesícules i vacúols no sembla ser un efecte específic de determinats fàrmacs, sinó més aviat una resposta d'algunes cèl·lules davant els danys produïts.

La formació massiva de vesícules i la formació de vacúols semblaven relacionades amb el grau d'afectació cel·lular, sent normalment major el nombre de vesícules i la mida dels vacúols en les cèl·lules amb més alteracions. Això fa pensar, tot i que amb la metodologia utilitzada no es pot determinar, que pugui tractar-se de vesícules i vacúols d'autofàgia. Les vesícules, per mida, podrien correspondre a autofagosomes, que corresponen a la primera fase de l'autofàgia en què els orgànuls són englobats per membrana i que en cèl·lules de mamífers solen tenir una mida entre 0,5 i 1,5 μm . Els vacúols podrien correspondre a autolisosomes o vacúols d'autofàgia, que són resultat de la fusió dels autofagosomes amb els lisosomes²³⁵. L'autofàgia és un mecanisme que activen algunes cèl·lules davant situacions d'estrès, per eliminar orgànuls, proteïnes i altres constituents interns danyats i obtenir molècules i energia per mantenir el metabolisme. Es tracta d'un mecanisme complex, que tant pot promoure la supervivència cel·lular com, en d'altres casos, acabar induint la mort de la cèl·lula. Igualment, mentre que en alguns casos l'autofàgia pot ser un mecanisme prooncogènic que afavoreixi la supervivència de les cèl·lules canceroses, en altres casos pot actuar com un mecanisme que evita la iniciació i progressió oncogènica, en eliminar les proteïnes i orgànuls aberrants i desencadenar la mort cel·lular en les cèl·lules més afectades²³⁶⁻²³⁹. El fet que, a diferència de les altres dues línies cel·lulars, en les EHEB s'observés una vacuolització important per sobre d'altres efectes podria respondre al metabolisme d'aquesta línia, més semblant al de les cèl·lules no leucèmiques. En tenir uns nivells de proliferació més baixos, els efectes del bloqueig del cicle cel·lular no es manifestarien com en les I83 i les Mec1, ja que en aquest cas les cèl·lules afectades no podrien progressar. En canvi, en resposta als fàrmacs, aquestes cèl·lules activarien de forma potent l'autofàgia per eliminar orgànuls afectats i minimitzar els danys produïts²³⁷. No es va observar en cap cas que la curcumina produís vacuolització ni formació de vesícules suggestives de que estigués induint autofàgia, tot i que està descrit que té un efecte modulador sobre aquest mecanisme^{232,238,239}.

Tots els efectes descrits semblaven relacionats amb l'entrada en apoptosi d'una part de les cèl·lules afectades, i amb tots els tractaments es va poder observar, en major o menor mesura, la presència de cossos apoptòtics, el que demostra que aquests tractaments són més o menys eficaços per induir la mort de les cèl·lules leucèmiques. La combinació amb curcumina no va generar canvis citomorfològics addicionals, però sí que, en alguns casos, va avançar l'aparició dels efectes o va incrementar l'afectació i el nombre de cossos apoptòtics, sobretot en les Mec1.

Efectes de la curcumina sobre la producció cel·lular de ROS

Ha quedat confirmat que la curcumina pot tenir un efecte modulador sobre el metabolisme de ROS en la LLC. La curcumina, per sí sola va augmentar lleugerament els nivells cel·lulars de ROS en les diferents línies cel·lulars estudiades. Aquests resultats es corresponen amb el que hi ha descrit en la bibliografia, i apunten a que aquest podria ser un potencial mecanisme pel qual la curcumina pot induir apoptosi de forma selectiva en les cèl·lules leucèmiques^{152,153}. No obstant això, combinada amb el TBHP, un agent prooxidant potent, la curcumina va disminuir la citotoxicitat produïda per aquest compost. Aquest efecte també és coherent, tenint en compte que la curcumina és antioxidant i està descrit el seu elevat potencial per captar i neutralitzar espècies reactives de l'oxigen^{87,88,150,151}. Així, l'efecte observat es podria tractar únicament d'antagonisme químic, però alhora fa pensar que la curcumina podria tenir un efecte negatiu en combinació amb alguns fàrmacs que actuen promovent la producció de ROS.

Val la pena remarcar que la curcumina va tenir un efecte additiu o sinèrgic per tots els fàrmacs estudiats, i que en cap cas es va observar un efecte antagonista significatiu. Tenint en compte que la curcumina té un mecanisme d'acció d'ampli espectre, afectant múltiples vies metabòliques, és esperable que produeixi un efecte sinèrgic amb la majoria de fàrmacs, fins en el cas que pogués actuar antagonicament en alguna via específica, com podria ser reduint l'oxidació. D'altra banda, cal remarcar també que el TBHP actua més amb un efecte químic que no pas farmacològic, com a agent prooxidant poc selectiu que indueix un fort estrès oxidatiu en les cèl·lules, sense generar gaires més efectes fora dels derivats de l'oxidació¹⁹², i que per tant, és normal que sigui neutralitzat parcialment per un antioxidant com la curcumina, ja que la seva acció es basa de forma molt exclusiva en aquesta producció de ROS. Aquest model d'acció no seria el de la majoria dels fàrmacs, que actuen de forma més selectiva i afectant normalment dianes biològiques per generar un efecte fisiològic a través de mecanismes farmacològics, més que no pas químics.

Com a apunt, el PMA no va induir la producció de ROS en els models cel·lulars estudiats. Això fa pensar que les cèl·lules estudiades podrien ser resistents a èsters de forbol.

Efectes de la curcumina sobre l'extrusió de fàrmacs

Un dels principals mecanismes de resistència i evasió als tractaments antineoplàsics per part de les cèl·lules tumorals és l'extrusió de fàrmacs mitjançant bombes ATP o transportadors de fàrmacs^{103,104,111}. La curcumina ha estat descrita com un important agent inhibidor d'alguns d'aquests transportadors^{103,105,111,112,114}. Per aquest motiu, es va voler avaluar aquest mecanisme de resistència en les diferents línies de LLC estudiades i l'efecte que podia tenir la curcumina modulant-lo.

L'existència de múltiples transportadors de fàrmacs, amb diferents especificitats i expressats de forma diferencial entre cèl·lules, fa que la interpretació dels resultats de les anàlisis sigui relativament complexa. Determinats substrats poden incrementar la intensitat de fluorescència de les cèl·lules amb l'addició d'uns determinats inhibidors, però no amb l'addició d'uns altres. Això seria a causa que el substrat està sent extrudit per uns transportadors que són inhibits per un inhibidor, però no per l'altre. A més, els transportadors poden presentar mutacions que tinguin com a efecte la resistència a l'efecte de l'inhibidor, i els propis inhibidors poden ser també extrudits, generant un efecte de competició amb el substrat fluorescent. També pot donar-se el cas contrari, que un inhibidor aparentment no sembli tenir cap efecte, perquè no afecta a la concentració intracel·lular d'un substrat, i que en canvi sí que afecti a l'extrusió d'un altre. Per afegir complexitat, cal tenir en compte el grau d'activació cel·lular, el grau diferencial d'expressió de transportadors i l'expressió simultània de diferents transportadors, fins i tot de formes mutants. Tot plegat fa que normalment calgui realitzar diverses anàlisis i interpretar els resultats obtinguts abans de poder extreure conclusions de l'efecte que realment s'està observant.

Els resultats obtinguts indiquen, en primer lloc, que totes tres línies cel·lulars tenen capacitat d'extrusió de fàrmacs. Les I83 serien les que tindrien la major capacitat d'extrusió, i per això l'efecte inhibitori de la curcumina va ser molt important. En les altres dues línies cel·lulars, l'efecte seria menor perquè l'extrusió basal de MTX, el substrat fluorescent, era inferior. Com més important és la capacitat d'extrusió de fàrmacs d'una cèl·lula, més important serà l'efecte observat en inhibir aquest mecanisme. A diferència de les I83, es va observar que la subpoblació I83 diploide no extrudia MTX. La raó podria ser que, en tenir el material genètic duplicat, les cèl·lules I83 tetraploides expressarien més transportadors, i per tant extrudirien més MTX. Les I83 diploides és probable que també n'extrudissin, amb una activitat massa reduïda per ser detectable amb les condicions establertes i amb les concentracions de MTX utilitzades.

En segon lloc, es confirma que la curcumina té capacitat d'inhibició dels transportadors de fàrmacs. Aquesta inhibició sembla fins i tot més potent que la que va produir l'I1, l'inhibidor experimental estudiat. Aparentment, l'MTX no semblava ser extrudida per les Mec1 quan es va utilitzar I1 com a inhibidor, en canvi, en utilitzar la curcumina es va veure que sí que era transportat. El motiu que prèviament no s'hagués detectat aquesta extrusió podria ser que I1 no inhibeixi algun transportador expressat en les Mec1 responsable de l'extrusió de l'MTX, ja que és un inhibidor específic. El compost I1 és un compost experimental

que té característiques similars a la fumitremorgina C, una toxina fúngica inhibidora del transportador de fàrmacs ABCG2^{240,241}. En canvi, la curcumina produeix una inhibició més inespecífica i que afecta una major varietat de transportadors^{103,105,111,112,114}. Segons la bibliografia, la curcumina seria un inhibidor competitiu⁸⁸, actuaria com a substrat de les bombes transportadores, contribuint a la seva saturació i reduint així la seva capacitat d'extrusió d'altres compostos.

En tercer lloc, els resultats obtinguts demostren que els diferents fàrmacs estudiats interactuen amb els transportadors de fàrmacs. No queda clar amb aquests experiments, si actuen com a inhibidors no competitius o bé com a substrats. En aquest segon cas, la implicació clínica seria major, ja que indicaria que aquestes cèl·lules tenen certa resistència als fàrmacs estudiats a causa de la seva expulsió del citosol. Sigui com sigui, la intensitat d'aquesta interacció seria moderada per fludarabina, citarabina i venetoclax, mentre que seria potent en el cas de l'ibrutinib. La curcumina, en ser administrada en combinació, va augmentar lleugerament l'efecte inhibitori sobre els transportadors. En canvi, va tenir molt poc efecte combinada amb l'ibrutinib. Aquest fet es pot atribuir a que aquest fàrmac ja devia produir una inhibició dels transportadors propera al 100% per sí sol.

A nivell pràctic, els resultats obtinguts indiquen que la curcumina té capacitat d'inhibició dels transportadors ABC i podria suposar una bona opció alternativa per incrementar les concentracions intracel·lulars de diversos fàrmacs i potenciar-ne l'efecte en la LLC. Això podria tenir efectes beneficiosos a nivell terapèutic en permetre reduir les dosis dels tractaments mantenint l'efecte, i com a mitjà per combatre la resistència a fàrmacs.

Efectes de la curcumina sobre l'activitat caspasa

Per a l'anàlisi de l'efecte de la curcumina sobre l'activitat de les caspases, es va posar a punt una tècnica per a la detecció genèrica de caspases activades, utilitzant una sonda profluorogènica compatible amb l'espectre d'emissió de la curcumina. Les anàlisis es van realitzar sobre cultius primaris, ja que hi ha diverses característiques que els fan més adequats que els models cel·lulars per avaluar l'efecte sobre aquest mecanisme. En primer lloc, cal tenir en compte que els models cel·lulars estan constituïts per cèl·lules immortalitzades i normalment tenen nivells basals d'apoptosi molt reduïts, de manera que podria ser que no s'observés activació de les caspases, i en cas d'observar-se, podria diferir de la resposta que realment tindrien les cèl·lules leucèmiques no immortalitzades. A més, per tal d'avaluar l'entrada en apoptosi és millor tenir certa heterogeneïtat cel·lular, amb cèl·lules més sensibles i més resistents, ja que les cèl·lules que no activen les caspases són un control intern excel·lent i una referència per avaluar l'efecte produït, en funció del percentatge de cèl·lules que sí que les activen. En el cas d'un cultiu molt homogeni, l'entrada en apoptosi podria ser molt uniforme, i no permetria extreure gaire informació sobre poblacions minoritàries i resistents. Finalment, en cultius primaris és possible analitzar l'activitat de les caspases conjuntament amb altres marcadors fenotípics, de manera que es poden avaluar

diferències en la sensibilitat a l'apoptosi i detectar subgrups de cèl·lules molt resistents.

Com s'ha comentat prèviament, un valor afegit d'aquest estudi ha estat la determinació de les condicions òptimes per realitzar l'anàlisi, que han permès proposar i desenvolupar un nou protocol de detecció de l'activitat caspasa en cèl·lules de LLC compatible amb la incubació amb curcumina. Les necessitats metodològiques han passat per trobar el moment òptim de detecció de les caspases actives, així com per obtenir diferents resultats vàlids de la resposta al llarg del temps. La complexitat de la preparatòria i la limitació del nombre de mostres disponibles ha impedit obtenir una major quantitat de resultats definitius. En estudis futurs que es realitzin utilitzant aquest protocol, caldrà realitzar prèviament un cribatge sobre un nombre de mostres més gran, cobrint el màxim ventall de temps possibles, a fi d'acabar de validar els resultats obtinguts i determinar amb més precisió els temps òptims d'incubació i anàlisi. L'objectiu seria determinar l'evolució de l'activació de les caspases al llarg del temps des de l'inici d'un estímul, i determinar en quin moment és més adequat realitzar les anàlisis. Segons les dades obtingudes en aquesta Tesi, sembla que el moment òptim per a la detecció de caspases actives se situaria al voltant de les 24 hores després de l'estímul que n'indueix l'activació. Els períodes de temps inferiors a 12 hores podrien ser insuficients perquè s'hagués produït una resposta, i a 48 hores o més, sembla que la resposta comença a estar esgotada. Tot i això, és probable que hi hagi nivells de resposta diferents entre els pacients estudiats, així com diferències en el moment en què es produeix el pic de màxima activitat. D'altra banda, en tractar-se de LLC, no es pot descartar que estudiant certes mostres no s'observi una resposta en cap moment, malgrat comprometre la integritat de la membrana cel·lular, i que les cèl·lules acabin morint per mecanismes independents de caspases. Tot i que sembla que la resistència de la LLC a l'apoptosi no és causada directament per defectes en les caspases, l'afectació de factors *upstream* de les vies intrínseca i extrínseca podria limitar-ne l'activació⁶⁸⁻⁷⁰.

Un altre factor que cal tenir en compte per a l'anàlisi són les condicions en què es realitza la incubació amb la curcumina i els fàrmacs. L'anàlisi dels nivells de caspases directament sobre sang sense lisar, envellida durant dies a temperatura ambient, va donar bons resultats per a realitzar una anàlisi basal. No obstant, els estudis consistents en afegir curcumina i altres possibles fàrmacs sobre cultius primaris requereixen tenir en compte paràmetres com el temps transcorregut des de l'extracció de la mostra, el temps transcorregut des de la sembra de les cèl·lules, i el temps que han estat en incubació amb la curcumina o els fàrmacs. Igualment, es fa necessari determinar el punt òptim per iniciar la incubació amb els fàrmacs, per tal que la resposta de les cèl·lules es vegi mínimament afectada per altres variables. Les proves realitzades semblen indicar que el moment òptim per iniciar la incubació amb els fàrmacs no es correspondria amb el mateix moment de sembrar les cèl·lules, ja que els nivells basals de caspases poden estar més elevats com a conseqüència de la manipulació de la mostra. D'altra banda, si ha transcorregut massa temps des de la sembra i el cultiu comença a envellir-se, la resposta a qualsevol estímul d'activació serà menor.

La curcumina va augmentar els nivells de caspases actives només en una de les mostres estudiades. Aquesta resposta es va produir en un moment molt concret, a les 24 hores d'incubació, i passades 24 hores més ja no es detectava cap efecte. Això confirma que l'activació de les caspases és un fet puntual en el transcurs de l'apoptosi, que té el seu pic en un moment específic del temps. Malgrat les limitacions en la mida mostral d'aquest estudi, el resultat positiu obtingut apuntaria a que la curcumina té la capacitat d'activar les caspases, tal com havien descrit estudis previs^{63,71-73}, amb variacions possiblement relacionades amb factors clínics i biològics dels pacients. Cal remarcar que els cultius primaris no van evidenciar un augment de les caspases amb la incubació amb curcumina, i tampoc ho van fer amb la incubació amb fludarabina ni camptotecina, el que fa pensar que les cèl·lules de la LLC podrien ser molt refractàries a l'activació de les caspases, i que passat cert temps, les cèl·lules viables romanents no activarien aquesta via ni tan sols en ser sotmeses a estímuls molt potents.

Finalment, és important remarcar que la curcumina va augmentar en major o en menor mesura el percentatge de cèl·lules amb pèrdua de la integritat de la membrana cel·lular en la majoria d'anàlisis de sinergisme realitzades en aquesta Tesi Doctoral, el que indicaria que té efecte citotòxic i la capacitat d'induir apoptosi en una part del total de les cèl·lules estudiades. El fet que l'efecte en l'activació de les caspases fos tan reduït apuntaria a que la curcumina està activant l'apoptosi per altres vies, independentment de l'activació de les caspases, com ha estat descrit en estudis previs^{74,75}. Aquest fet és de gran importància, atès que implicaria que la curcumina tindria la capacitat d'induir apoptosi en cèl·lules amb mutacions i canvis metabòlics que comprometen aquesta via, de manera que podria ser una opció adequada per complementar els tractaments i potenciar-ne l'efecte en pacients amb aquestes característiques. Per la seva gran rellevància clínica, l'estudi de l'activitat de les caspases en pacients amb LLC i el potencial efecte inductor de la curcumina s'haurà d'investigar amb més profunditat en propers estudis, mirant d'establir possibles associacions amb altres biomarcadors i augmentant la mida mostral.

Limitacions

Els estudis realitzats han estat subjectes a certes limitacions. En primer lloc, els cultius cel·lulars s'han realitzat en condicions de normòxia, és a dir, amb una concentració d'oxigen del 21%. Tot i que la majoria d'estudis *in vitro* es realitzen d'aquesta manera, cal remarcar que no és l'òptim, ja que les condicions fisiològiques en què es troben les cèl·lules en l'organisme són de baixes concentracions d'oxigen, al voltant del 2-10%. Aquesta diferència de la concentració d'oxigen pot generar canvis en l'expressió de gens, en la presència de molècules d'adhesió, en les taxes de proliferació i supervivència, o en la resistència a fàrmacs²⁴². Cal afegir que les cèl·lules més primitives i resistents, entre elles les cèl·lules mare, se solen situar a la medul·la òssia, on es troben les concentracions d'oxigen més baixes, i que podrien promoure una elevada resistència a diferents fàrmacs i a la curcumina²⁴³.

En el mateix sentit, cal puntualitzar que en la LLC les cèl·lules en proliferació es concentren a la medul·la i els nòduls limfàtics, mentre que les cèl·lules que es troben circulants a la sang estan, en la seva majoria, en fase G0G1 del cicle cel·lular¹⁹⁴. Així doncs, les mostres disponibles no sempre serien les òptimes per estudiar les cèl·lules més proliferatives i que, probablement són les més importants per la progressió i manteniment de la malaltia malgrat els tractaments. El disseny dels experiments ha respost a la disponibilitat de les mostres, ja que les mostres de medul·la òssia són molt menys abundants i normalment es requereix la pràctica totalitat del volum obtingut per a les anàlisis clíniques que es realitzen.

Pel que fa als estudis amb línies cel·lulars, cal remarcar que la LLC és un tipus de leucèmia que presenta dificultats per establir-se en línia immortalitzada¹⁹⁴, de manera que la varietat de línies que es pot trobar és limitada i en molts casos, presenten problemes com un creixement molt lent i amb dificultats de cultiu, o l'adquisició d'alteracions, derivades de la immortalització, com poden ser pèrdua de CD5^{194,195}, canvis en les taxes de proliferació, canvis morfològics, de compactació de la cromatina... Totes aquestes alteracions fan que les línies amb què es treballa s'allunyin de les característiques originals de la malaltia.

Finalment, les anàlisis sobre sinergisme han estat subjectes a les limitacions de coneixement actuals de la LLC. Encara que els tractaments es dirigeixen a reduir i eliminar la presència de les cèl·lules leucèmiques en sang, aquest no seria el principal objectiu per assolir la curació de la LLC, ja que en principi, l'origen de la malaltia es trobaria en subpoblacions de cèl·lules més primitives, refractàries i molt minoritàries. Aquestes cèl·lules, que sembla que es podrien trobar en el compartiment de les HSC⁵¹, són encara molt desconegudes, i serien clau en el manteniment de la malaltia a llarg termini i les recaigudes, i haurien de ser la diana dels tractaments per tal d'assolir la curació. Malgrat l'avenç del nou mètode implementat per detectar els nivells de fosfatasa alcalina i cèl·lules leucèmiques més primitives i resistents, la identitat real de les cèl·lules responsables de la refractarietat de la LLC segueix encara sent una incògnita. Tot i aquesta limitació val la pena remarcar que, com que la progressió de la LLC sol ser lenta i la malaltia sol aparèixer en edats avançades, els sistemes de tractament actuals es poden considerar prou adequats, ja que en la majoria dels casos permeten controlar i cronificar la malaltia, permetent dur un estil de vida pràcticament normal en molts casos. L'aparició novament de malaltia i la seva progressió cap a fases més agressives és el principal problema que pot acabar-se donant a llarg termini. En aquest sentit, la curcumina podria ser un complement eficaç per allargar aquests terminis i per fer que els tractaments tinguin menys efectes adversos i influeixin menys negativament en la qualitat de vida dels pacients.

Resum i futurs estudis

Com s'ha comentat prèviament, la LLC és una malaltia hematològica d'elevada incidència en països occidentals^{1,3}, que suposa una important reducció de la qualitat de vida dels pacients. Malgrat no ser una de les leucèmies més agressives ni presentar unes taxes de creixement especialment elevades, les cèl·lules d'aquests pacients presenten una sensibilitat a l'apoptosi molt reduïda i

un elevada resistència als tractaments⁶⁻⁸, tal com s'ha pogut demostrar en aquesta Tesi Doctoral. La LLC es comporta com una malaltia crònica, que acaba reapareixent amb el temps després dels tractaments, i que va progressant cap a estadis més avançats, amb una simptomatologia més severa i limitant pels pacients i una major resistència a les teràpies, les quals han anat evolucionant al llarg dels anys a fi d'adequar-se als requeriments terapèutics i limitacions de salut d'aquests pacients^{1,2,4}.

Cada vegada es fa més evident la importància de l'alimentació, així com d'altres hàbits de vida, a l'hora de mantenir una bona salut, que acaba sent fonamental en la prevenció de moltes malalties. Tot i que el component genètic té un paper cabdal en el desenvolupament de molts tipus de càncer i leucèmia, molts factors ambientals, com són l'alimentació i els hàbits de vida saludables, poden acabar tenint un paper clau a l'hora de prevenir les neoplàsies, i fins en el cas que s'acabin donant, millorar la resposta i recuperació de l'organisme enfront els danys produïts per la quimioteràpia, el que acaba sent decisiu en el pronòstic de qualsevol malaltia. Alhora, cal fer èmfasi en la realitat bioquímica de molts aliments i compostos naturals, sobretot quan és freqüent trobar casos en què, per desconeixement, s'engloba la fitoteràpia en el grup de les pseudociències. No s'ha d'oblidar que la farmacologia té els seus inicis en l'ús d'ingredients naturals amb principis actius, i que molts dels medicaments utilitzats avui dia tenen l'origen en compostos vegetals utilitzats des de fa segles. Així doncs, a part de la seva importància en l'alimentació per mantenir una bona salut, molts compostos naturals poden exercir un verdader efecte farmacològic en l'organisme, afectant enzims o vies metabòliques tal i com ho poden fer els principis actius dels fàrmacs, salvant la distància de la dosi. En aquest sentit, l'ús de complements alimentaris o compostos vegetals amb una baixa toxicitat resulta una via de gran interès per complementar les teràpies, amb capacitat per potenciar tractaments, reduint les dosis de fàrmacs i els efectes adversos. Tenint en compte la naturalesa crònica de la LLC i que molts dels pacients que la contrauen són d'edat avançada i presenten altres comorbiditats, resulta especialment rellevant el potencial ús de compostos naturals que contribueixin a millorar la qualitat de vida dels pacients i permetin mantenir l'efecte dels tractaments reduint-ne les dosis.

Els estudis realitzats en aquesta Tesi Doctoral s'han centrat en la curcumina, un polifenol obtingut de la cúrcuma, com a compost nutracèutic amb potencial per actuar com a coadjuvant de les teràpies. La curcumina ha estat estudiada en molts tipus de càncer pels seus efectes quimiosensibilitzadors, proapoptòtics i antioxidants, entre d'altres^{58,59,87,88}. Precisament pel seu potencial proapoptòtic, resulta de gran interès pel tractament de la LLC, i curiosament, val la pena remarcar que aquesta malaltia tan freqüent en països occidentals és una malaltia minoritària en països asiàtics⁴, on hi ha un major consum quotidià de cúrcuma, malgrat que no s'ha estudiat la importància d'aquesta variable concreta en aquest fet, que probablement està influït per paràmetres genètics i moltes altres variables ambientals. Com s'ha vist amb els diferents experiments realitzats, la curcumina s'ha mostrat efectiva en la potenciació sinèrgica de la citotoxicitat de diversos fàrmacs, tant sobre models cel·lulars derivats de LLC com en els cultius primaris establerts a partir de mostres de sang perifèrica de pacients amb aquesta malaltia. A més, la curcumina ha demostrat la capacitat de produir

bloqueig del cicle cel·lular i de modular vies metabòliques i enzims clau, com són la producció cel·lular de ROS, l'extrusió de fàrmacs, els nivells d'activitat ALP de les cèl·lules i l'activació de les caspases, amb els diferents matisos que s'han anat comentant en els respectius apartats.

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que la curcumina té el potencial per incrementar l'efecte de diversos fàrmacs i modular mecanismes que poden afavorir l'entrada en apoptosi de les cèl·lules o l'eliminació de forma més eficient de les cèl·lules més refractàries. Alhora, s'han trobat variacions importants, tant entre els diferents models cel·lulars utilitzats com entre cultius primaris, el que fa pensar que l'efecte de la curcumina pot ser molt variable en funció de l'estat clínic dels pacients. En aquest sentit, caldrà realitzar més estudis per confirmar amb una major mida mostral alguns dels resultats obtinguts, i alhora aprofundir en l'impacte genètic i mutacional dels pacients en la resposta. A més, havent confirmat la utilitat de la citòmica funcional per aquest tipus d'anàlisis, es pretén que aquesta Tesi pugui servir com una base per a futures investigacions basades en metodologies similars, estudiant el potencial efecte de la curcumina sobre altres neoplàsies, així com afavorint el cribatge de múltiples compostos naturals amb potencial per actuar com a adjuvants en les teràpies actuals. Finalment, esperem que aquests estudis puguin representar una aportació en la recerca per tractar la leucèmia, i que en la vessant clínica concretament, hagin pogut servir per contribuir donar a conèixer millor el paper de la nutriciologia com a camp poc estudiat i amb un gran potencial per millorar l'efectivitat dels tractaments i la qualitat de vida dels pacients.

Conclusions

1. La curcumina ha demostrat un efecte sinèrgic en combinació amb diversos fàrmacs estudiats, confirmant el seu potencial com a adjuvant en les teràpies.
2. La curcumina mostra activitat sobre diferents mecanismes relacionats amb l'apoptosi i la sensibilitat a fàrmacs de les cèl·lules de la LLC, com són la modulació de les espècies reactives de l'oxigen i dels transportadors de fàrmacs.
3. A nivell general, els resultats obtinguts mostren que la curcumina té activitat proapoptòtica en les cèl·lules de la LLC.
4. La curcumina demostra un potencial elevat per erradicar les cèl·lules amb característiques de cèl·lula mare més primitiva i refractària.
5. L'efecte de la curcumina podria variar considerablement en funció del pacient i del fàrmac amb què es combini.
6. La citòmica funcional demostra una gran utilitat per a l'estudi del metabolisme cel·lular, així com per identificar cèl·lules molt minoritàries implicades amb la refractarietat gràcies a la combinació d'anàlisis fenotípiques i funcionals.
7. Els nous mètodes desenvolupats poden ser aplicables a l'estudi d'altres tipus de càncer hematològic o càncer sòlid.
8. La curcumina té una toxicitat baixa sobre cèl·lules normals. És important remarcar que la curcumina pot interferir amb alguns fàrmacs i produir efectes negatius, un factor a tenir en compte de cara a un hipotètic ús com a adjuvant en els tractaments.
9. Els resultats obtinguts confirmen el valor de la curcumina com a principi natural actiu i de baixa toxicitat, amb potencial en el camp de la nutriciologia.
10. És necessari plantejar nous estudis que permetin avaluar clínicament l'efecte de compostos nutricionalment com la curcumina, garantint la seguretat dels pacients i alhora permetent la transferència dels resultats quan s'estudien compostos no patentables amb potencial per millorar els tractaments.

Bibliografia

1. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26:vi50-vi54. doi:10.1093/annonc/mdv303
2. O'Brien S, Kay NE. Maintenance therapy for B-chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2011;9(1):22-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326143>. Accessed October 9, 2019.
3. Hus I, Roliński J. Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)*. 2015;19(5):361-367. doi:10.5114/wo.2015.55410
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Vol 117.; 2011. doi:10.1182/blood-2011-01-293050
5. Martínez-Trillos A, Quesada V, Villamor N, Puente XS, López-Otín C, Campo E. Recurrent gene mutations in CLL. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:87-107. doi:10.1007/978-1-4614-8051-8_4
6. Gale RP, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Keating M, Montserrat E, Rai K. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. International Workshop on chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia*. 1994;8(9):1610-1614. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522296>. Accessed October 9, 2019.
7. Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D, Gil J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1997;89(9):3378-3384. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129045>. Accessed October 9, 2019.
8. Thompson PA, Wierda WG. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: Working toward cure for patients with CLL. *Blood*. 2016;127(3):279-286. doi:10.1182/blood-2015-08-634816
9. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):980-988. doi:10.1200/JCO.2011.36.9348
10. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456. doi:10.1182/blood-2007-06-093906
11. Demir C, Kara E, Ekinci Ö, Ebinç S. Clinical and laboratory features of CD5-negative Chronic Lymphocytic Leukemia. *Med Sci Monit*. 2017;23:2137-2142. doi:10.12659/MSM.901781
12. Sorigue M, Junca J. Atypical chronic lymphocytic leukemia: Brief historical

- overview and current usage of an equivocal concept. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(1):e17-e19. doi:10.1111/ijlh.12930
13. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206. doi:10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V
 14. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1139039>. Accessed October 10, 2019.
 15. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol*. 2009;27(10):1637-1643. doi:10.1200/JCO.2008.18.1701
 16. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(5-6):439-447. doi:10.3109/10428199609054782
 17. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):859-861. doi:10.1182/blood-2005-04-1677
 18. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8). doi:10.1056/NEJMra041720
 19. Dürig J, Nüchel H, Cremer M, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003;17(12):2426-2434. doi:10.1038/sj.leu.2403147
 20. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98(1):181-186. doi:10.1182/blood.V98.1.181
 21. Döhner H, Stilgenbauer S, Fischer K, Schröder M, Bentz M, Lichter P. Diagnosis and monitoring of chromosome aberrations in hematological malignancies by fluorescence in situ hybridization. *Stem Cells*. 1995;13(3 S):76-82. doi:10.1002/stem.5530130712
 22. Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P, Döhner H. Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 1998;76(3-4):101-110. doi:10.1007/s002770050373
 23. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997;89(7):2516-2522. doi:10.1182/blood.v89.7.2516
 24. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26 I):1910-1916. doi:10.1056/NEJM200012283432602

25. El Rouby S, Thomas A, Costin D, et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 1993;82(11):3452-3459. doi:10.1182/blood.v82.11.3452.bloodjournal82113452
26. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 Gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580-1589. doi:10.1182/blood.v85.6.1580.bloodjournal8561580
27. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *Onco Targets Ther*. 2013;7:57-67. doi:10.2147/OTT.S53876
28. Alberts Bruce et al. *Molecular Biology of the Cell*; 1983. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
29. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood*. 2011;117(11):3016-3024. doi:10.1182/blood-2010-08-304683
30. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol*. 2015;1(7):965-974. doi:10.1001/jamaoncol.2015.0779
31. Abruzzo L V, Herling CD, Calin GA, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica*. 2018;103(12):2069-2078. doi:10.3324/haematol.2018.190132
32. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood*. 2014;123(26):4101-4110. doi:10.1182/blood-2014-01-552307
33. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009;113(4):856-865. doi:10.1182/blood-2008-02-139725
34. Ramsay AJ, Rodríguez D, Villamor N, et al. Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(7):1600-1603. doi:10.1038/leu.2012.344
35. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol*. 2008;140(5):537-546. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06965.x
36. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(2):865-873. doi:10.1182/blood-2007-05-092486

37. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(9):897-904. doi:10.1200/JCO.2013.50.8515
38. Gooden CE, Jones P, Bates R, et al. CD49d shows superior performance characteristics for flow cytometric prognostic testing in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2018;94(1):129-135. doi:10.1002/cyto.b.21384
39. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338(21):1506-1514. doi:10.1056/NEJM199805213382104
40. Shustik C, Mick R, Silver R, Sawitsky A, Rai K, Shapiro L. Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: Intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol*. 1988;6(1):7-12. doi:10.1002/hon.2900060103
41. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: Stem cell transplantation or novel agents? *Blood*. 2014;124(26):3841-3849. doi:10.1182/blood-2014-07-586826
42. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: The EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 2007;21(1):12-17. doi:10.1038/sj.leu.2404441
43. Dreger P, Döhner H, Ritgen M, et al. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: Long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood*. 2010;116(14):2438-2447. doi:10.1182/blood-2010-03-275420
44. Venetoclax - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11581>. Accessed August 17, 2020.
45. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, et al. Venetoclax-rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(12):1107-1120. doi:10.1056/NEJMoa1713976
46. Brion A, Mahé B, Kolb B, et al. Autologous transplantation in CLL patients with B and C Binet stages: Final results of the prospective randomized GOELAMS LLC 98 trial. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(4):542-548. doi:10.1038/bmt.2011.117
47. Scarfò L, Chatzikonstantinou T, Rigolin GM, et al. COVID-19 severity and mortality in patients with chronic lymphocytic leukemia: a joint study by ERIC, the European Research Initiative on CLL, and CLL Campus. *Leukemia*. 2020;34(9):2354-2363. doi:10.1038/s41375-020-0959-x
48. Mato AR, Roeker LE, Lamanna N, et al. Outcomes of COVID-19 in patients with CLL: a multicenter international experience. *Blood*. 2020;136(10):1134-1143. doi:10.1182/blood.2020006965

49. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/nm0797-730
50. Nguyen L V., Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: An evolving concept. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):133-143. doi:10.1038/nrc3184
51. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246-259. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.029
52. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1253-1261. doi:10.1056/NEJMra061808
53. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: Entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-841. doi:10.1016/S0092-8674(01)00409-3
54. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997;3(12):1337-1345. doi:10.1038/nm1297-1337
55. Nunez-Espinosa C, Garcia-Godoy M, Ferreira I, et al. Vybrant DyeCycle Violet Stain Discriminates Two Different Subsets of CD34+ Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(1):66-71. doi:10.2174/1574888x10666150528152547
56. Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford J, Petriz J. Is alkaline phosphatase the smoking gun for highly refractory primitive leukemic cells? *Oncotarget*. 2016;7(44):72057-72066. doi:10.18632/oncotarget.12497
57. Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Petriz J. Flow cytometric significance of cellular alkaline phosphatase activity in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2019;10(65):6969-6980. doi:10.18632/oncotarget.27356
58. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti S V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(11):1631-1652. doi:10.1007/s00018-008-7452-4
59. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules*. 2015;20(2):2728-2769. doi:10.3390/molecules20022728
60. Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett*. 2002;512(1-3):334-340. doi:10.1016/S0014-5793(02)02292-5
61. Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem*. 2005;280(20):20059-20068.

doi:10.1074/jbc.M410670200

62. Park M-J, Kim E-H, Park I-C, et al. Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. *Int J Oncol.* 2002;21(2):379-383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118335>. Accessed April 4, 2020.
63. Bush JA, Cheung KJJ, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res.* 2001;271(2):305-314. doi:10.1006/excr.2001.5381
64. Watson JL, Hill R, Yaffe PB, et al. Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2010;297(1):1-8. doi:10.1016/j.canlet.2010.04.018
65. Li F, Chen X, Xu B, Zhou H. Curcumin induces p53-independent necrosis in H1299 cells via a mitochondria-associated pathway. *Mol Med Rep.* 2015;12(5):7806-7814. doi:10.3892/mmr.2015.4395
66. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia.* 1996;10(3):456-459.
67. Venetoclax | C45H50ClN7O7S - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/49846579#section=Structures>. Accessed January 23, 2020.
68. Pettitt AR, Cawley JC. Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2000;109(4):800-804. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02068.x
69. Patel V, Balakrishnan K, Keating MJ, Wierda WG, Gandhi V. Expression of executioner procaspases and their activation by a procaspase-activating compound in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2015;125(7):1126-1136. doi:10.1182/blood-2014-01-546796
70. King D, Pringle JH, Hutchinson M, Cohen GM. Processing/activation of caspases, -3 and -7 and -8 but not caspase-2, in the induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 1998;12(10):1553-1560. doi:10.1038/sj.leu.2401153
71. Hayun R, Okun E, Berrebi A, et al. Rapamycin and curcumin induce apoptosis in primary resting B chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(4):625-632. doi:10.1080/10428190902789181
72. Ye MX, Zhao YL, Li Y, et al. Curcumin reverses cis-platin resistance and promotes human lung adenocarcinoma A549/DDP cell apoptosis through HIF-1 α and caspase-3 mechanisms. *Phytomedicine.* 2012;19(8-9):779-787. doi:10.1016/j.phymed.2012.03.005
73. Jiang AJ, Jiang G, Li LT, Zheng JN. Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma

- cells. *Mol Biol Rep.* 2015;42(1):267-275. doi:10.1007/s11033-014-3769-2
74. Ghosh AK, Kay NE, Secreto CR, Shanafelt TD. Curcumin inhibits prosurvival pathways in chronic lymphocytic leukemia B cells and may overcome their stromal protection in combination with EGCG. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1250-1258. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1511
 75. Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFκB transcription factors. *J Neurochem.* 2007;102(2):522-538. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04633.x
 76. Varghese E, Samuel SM, Abotaleb M, Cheema S, Mamtani R, Büsselberg D. The “Yin and Yang” of natural compounds in anticancer therapy of triple-negative breast cancers. *Cancers (Basel).* 2018;10(10). doi:10.3390/cancers10100346
 77. Zhou X, Su J, Feng S, et al. Antitumor activity of curcumin is involved in down-regulation of YAP/TAZ expression in pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(48):79076-79088. doi:10.18632/oncotarget.12596
 78. Liu Z-C, Yang Z-X, Zhou J-S, et al. Curcumin regulates hepatoma cell proliferation and apoptosis through the Notch signaling pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(3):714-718. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753768>. Accessed April 6, 2020.
 79. Subramaniam D, Ponnurangam S, Ramamoorthy P, et al. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PLoS One.* 2012;7(2):e30590. doi:10.1371/journal.pone.0030590
 80. Liao S, Xia J, Chen Z, et al. Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of notch-1 and NF-κB signaling pathways. *J Cell Biochem.* 2011;112(4):1055-1065. doi:10.1002/jcb.23019
 81. Colomer C, Margalef P, Villanueva A, et al. IKKα Kinase Regulates the DNA Damage Response and Drives Chemo-resistance in Cancer. *Mol Cell.* 2019;75(4):669-682.e5. doi:10.1016/j.molcel.2019.05.036
 82. Pickering BM, De Mel S, Lee M, et al. Pharmacological inhibitors of NF-κB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene.* 2007;26(8):1166-1177. doi:10.1038/sj.onc.1209897
 83. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6). doi:10.1101/cshperspect.a001651
 84. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-κB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell.* 2017;168(1-2):37-57. doi:10.1016/j.cell.2016.12.012
 85. Simon-Gabriel CP, Foerster K, Saleem S, et al. Microenvironmental stromal cells abrogate NF-κB inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2018;103(1):136-147.

doi:10.3324/haematol.2017.165381

86. Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(5):700-713. doi:10.1016/j.bcp.2005.04.043
87. Curcumin | IC21H20O6 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516>. Accessed January 17, 2020.
88. Curcumin - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11672>. Accessed January 17, 2020.
89. Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood.* 2003;101(3):1053-1062. doi:10.1182/blood-2002-05-1320
90. Everett PC, Meyers JA, Makkinje A, Rabbi M, Lerner A. Preclinical assessment of curcumin as a potential therapy for B-CLL. *Am J Hematol.* 2007;82(1):23-30. doi:10.1002/ajh.20757
91. Janovská P, Bryja V. Wnt signalling pathways in chronic lymphocytic leukaemia and B-cell lymphomas. *Br J Pharmacol.* 2017;174(24):4701-4715. doi:10.1111/bph.13949
92. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):3118-3123. doi:10.1073/pnas.0308648100
93. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4(2):68-75. doi:10.4161/org.4.2.5851
94. Yen HY, Tsao CW, Lin YW, Kuo CC, Tsao CH, Liu CY. Regulation of carcinogenesis and modulation through Wnt/ β -catenin signaling by curcumin in an ovarian cancer cell line. *Sci Rep.* 2019;9(1):17267. doi:10.1038/s41598-019-53509-3
95. Vallée A, Lecarpentier Y, Vallée JN. Curcumin: A therapeutic strategy in cancers by inhibiting the canonical WNT/ β -catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):323. doi:10.1186/s13046-019-1320-y
96. Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, et al. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood.* 2010;115(14):2852-2863. doi:10.1182/blood-2009-10-230060
97. Aggarwal BB, Sethi G, Kwang SA, et al. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: Modern target but ancient solution. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 1091. Blackwell Publishing Inc.; 2006:151-169. doi:10.1196/annals.1378.063

98. Dae JK, Chan KS, Sano S, DiGiovanni J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. In: *Molecular Carcinogenesis*. Vol 46. Mol Carcinog; 2007:725-731. doi:10.1002/mc.20342
99. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3140-3148. doi:10.1172/JCI119869
100. Hu A, Huang JJ, Jin XJ, et al. Curcumin suppresses invasiveness and vasculogenic mimicry of squamous cell carcinoma of the larynx through the inhibition of JAK-2/STAT-3 signaling pathway. *Am J Cancer Res*. 2015;5(1):278-288.
101. Ashrafizadeh M, Rafiei H, Mohammadinejad R, Afshar EG, Farkhondeh T, Samarghandian S. Potential therapeutic effects of curcumin mediated by JAK/STAT signaling pathway: A review. *Phyther Res*. 2020;34(8):1745-1760. doi:10.1002/ptr.6642
102. Khan AQ, Ahmed EI, Elareer N, et al. Curcumin-mediated apoptotic cell death in papillary thyroid cancer and cancer stem-like cells through targeting of the JAK/STAT3 signaling pathway. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2). doi:10.3390/ijms21020438
103. Li H, Krstin S, Wink M. Modulation of multidrug resistant in cancer cells by EGCG, tannic acid and curcumin. *Phytomedicine*. 2018;50:213-222. doi:10.1016/j.phymed.2018.09.169
104. Svirnovski AI, Shman T V, Serhiyenka TF, Savitski VP, Smolnikova V V, Fedasenka UU. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology*. 2009;14(4):204-212. doi:10.1179/102453309X426218
105. Lee CK, Ki SH, Choi JS. Effects of oral curcumin on the pharmacokinetics of intravenous and oral etoposide in rats: Possible role of intestinal CYP3A and P-gp inhibition by curcumin. *Biopharm Drug Dispos*. 2011;32(4):245-251. doi:10.1002/bdd.754
106. P-glycoprotein inhibitors - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002667>. Accessed March 31, 2020.
107. Maynadié M, Matutes E, Catovsky D. Quantification of P-glycoprotein in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Leuk Res*. 1997;21(9):825-831. doi:10.1016/s0145-2126(97)00069-6
108. Svoboda-Beusan I, Kusec R, Bendelja K, et al. The relevance of multidrug resistance-associated P-glycoprotein expression in the treatment response of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2000;85(12):1261-1267. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114132>. Accessed April 3, 2020.
109. Wang JQ, Li JY, Teng QX, et al. Venetoclax, a BCL-2 inhibitor, enhances

- the efficacy of chemotherapeutic agents in wild-type ABCG2-overexpression-mediated MDR cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2). doi:10.3390/cancers12020466
110. BCRP/ABCG2 Inhibitors - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002662>. Accessed March 31, 2020.
 111. Chearwae W, Shukla S, Limtrakul P, Ambudkar S V. Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(8):1995-2006. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0087
 112. Limtrakul P, Chearwae W, Shukla S, Phisalpong C, Ambudkar S V. Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol Cell Biochem*. 2007;296(1-2):85-95. doi:10.1007/s11010-006-9302-8
 113. Quiney C, Billard C, Faussat AM, Salanoubat C, Kolb JP. Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(8):1587-1599. doi:10.1080/10428190701474332
 114. Chearwae W, Wu CP, Chu HY, Lee TR, Ambudkar S V., Limtrakul P. Curcuminoids purified from turmeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(3):376-388. doi:10.1007/s00280-005-0052-1
 115. Burger H, Nooter K, Sonneveld P, Van Wingerden KE, Zaman GJR, Stoter G. High expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chronic and prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1994;88(2):348-356. doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb05030.x
 116. Beck J, Niethammer D, Gekeler V. MDR1, MRP, topoisomerase IIalpha/beta, and cyclin A gene expression in acute and chronic leukemias. *Leukemia*. 1996;10 Suppl 3:S39-S45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8656699>. Accessed April 25, 2020.
 117. Juszczynski P, Niewiarowski W, Krykowski E, Robak T, Warzocha K. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(1):153-158. doi:10.1080/10428190210198
 118. Webb M, Brun M, Mcniven M, Le Couteur D, Craft P. MDR1 and MRP expression in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*. 1998;102(3):710-717. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00822.x
 119. World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. World Health Organization; 1999.
 120. Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med*. 1991;57(1):1-7. doi:10.1055/s-2006-960004

121. Ahsan H, Parveen N, Khan NU, Hadi SM. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem Biol Interact.* 1999;121(2):161-175. doi:10.1016/S0009-2797(99)00096-4
122. Yodkeeree S, Ampasavate C, Sung B, Aggarwal BB, Limtrakul P. Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol.* 2010;627(1-3):8-15. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.052
123. Hatamipour M, Ramezani M, Tabassi SAS, Johnston TP, Sahebkar A. Demethoxycurcumin: A naturally occurring curcumin analogue for treating non-cancerous diseases. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):19320-19330. doi:10.1002/jcp.28626
124. Pei H, Yang Y, Cui L, et al. Bisdemethoxycurcumin inhibits ovarian cancer via reducing oxidative stress mediated MMPs expressions. *Sci Rep.* 2016;6:28773. doi:10.1038/srep28773
125. Chen AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 2001;21(4 B):2895-2900.
126. Ramirez-Ahumada M del C, Timmermann BN, Gang DR. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry.* 2006;67(18):2017-2029. doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.028
127. Kita T, Imai S, Sawada H, Kumagai H, Seto H. The biosynthetic pathway of curcuminoid in turmeric (*Curcuma longa*) as revealed by ¹³C-labeled precursors. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72(7):1789-1798. doi:10.1271/bbb.80075
128. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules.* 2014;19(12):20091-20112. doi:10.3390/molecules191220091
129. Ali Z, Saleem M, Atta BM, Khan SS, Hammad G. Determination of curcuminoid content in turmeric using fluorescence spectroscopy. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;213:192-198. doi:10.1016/j.saa.2019.01.028
130. Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini KI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2008;1780(4):673-679. doi:10.1016/j.bbagen.2007.11.016
131. Ponnuvel K, Santhiya K, Padmini V. Curcumin based chemosensor for selective detection of fluoride and cyanide anions in aqueous media. *Photochem Photobiol Sci.* 2016;15(12):1536-1543. doi:10.1039/c6pp00254d
132. Chignell CF, Bilskj P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral

- and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994;59(3):295-302. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05037.x
133. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PSSR. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 1998;64(4):353-356. doi:10.1055/s-2006-957450
 134. Mirhafez SR, Farimani AR, Gholami A, Hooshmand E, Tavallaie S, Nobakht Gh FFM. The effect of curcumin with piperine supplementation on pro-oxidant and antioxidant balance in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Drug Metab Pers Ther.* 2019;34(2). doi:10.1515/dmpt-2018-0040
 135. Panahi Y, Khalili N, Sahebi E, et al. Curcuminoids Plus Piperine Modulate Adipokines in Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Clin Pharmacol.* 2017;12(4):253-258. doi:10.2174/1574884713666180104095641
 136. Singh S, Jamwal S, Kumar P. Piperine Enhances the Protective Effect of Curcumin Against 3-NP Induced Neurotoxicity: Possible Neurotransmitters Modulation Mechanism. *Neurochem Res.* 2015;40(8):1758-1766. doi:10.1007/s11064-015-1658-2
 137. Bolat ZB, Islek Z, Demir BN, Yilmaz EN, Sahin F, Ucisik MH. Curcumin- and Piperine-Loaded Emulsomes as Combinational Treatment Approach Enhance the Anticancer Activity of Curcumin on HCT116 Colorectal Cancer Model. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. doi:10.3389/fbioe.2020.00050
 138. Tu YS, Sun DM, Zeng XH, et al. Piperine potentiates the hypocholesterolemic effect of curcumin in rats fed on a high fat diet. *Exp Ther Med.* 2014;8(1):260-266. doi:10.3892/etm.2014.1717
 139. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Majeed M, Sahebkar A. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. *Clin Nutr.* 2015;34(6):1101-1108. doi:10.1016/j.clnu.2014.12.019
 140. Panahi Y, Valizadegan G, Ahamdi N, Ganjali S, Majeed M, Sahebkar A. Curcuminoids plus piperine improve nonalcoholic fatty liver disease: A clinical trial. *J Cell Biochem.* 2019;120(9):15989-15996. doi:10.1002/jcb.28877
 141. Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, Jalili A, Banikazemi Z, Sahebkar A. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:102-112. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.098
 142. Zhang J, Tang Q, Xu X, Li N. Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery. *Int J Pharm.* 2013;448(1):168-174. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.03.021
 143. Nasery MM, Abadi B, Poormoghadam D, et al. Curcumin delivery

- mediated by bio-based nanoparticles: A review. *Molecules*. 2020;25(3). doi:10.3390/molecules25030689
144. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol Pharm*. 2007;4(6):807-818. doi:10.1021/mp700113r
 145. Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP, Gescher AJ. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;60(2):171-177. doi:10.1007/s00280-006-0355-x
 146. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*. 1980;16(3):259-265. doi:10.1016/0300-483X(80)90122-5
 147. Marczylo TH, Steward WP, Gescher AJ. Rapid analysis of curcumin and curcumin metabolites in rat biomatrices using a novel ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method. *J Agric Food Chem*. 2009;57(3):797-803. doi:10.1021/jf803038f
 148. Gutierrez VO, Campos ML, Arcaro CA, et al. Curcumin Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evidences in Streptozotocin-Diabetic Rats Support the Antidiabetic Activity to Be via Metabolite(s). 2015. doi:10.1155/2015/678218
 149. van't Land B, Blijlevens NMA, Marteijs J, et al. Role of curcumin and the inhibition of NF-KB in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia*. 2004;18(2):276-284. doi:10.1038/sj.leu.2403233
 150. Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One*. 2011;6(10). doi:10.1371/journal.pone.0026012
 151. Indira Priyadarsini K. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. *Curr Pharm Des*. 2013;19(11):2093-2100. doi:10.2174/138161213805289228
 152. Papież MA, Krzyściak W, Szade K, et al. Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:557-570. doi:10.2147/DDDT.S92687
 153. Huang YF, Zhu DJ, Chen XW, et al. Curcumin enhances the effects of irinotecan on colorectal cancer cells through the generation of reactive oxygen species and activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *Oncotarget*. 2017;8(25):40264-40275. doi:10.18632/oncotarget.16828
 154. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(7):1894-1900.
 155. Zaidi A, Lai M, Cavenagh J. Long-term stabilisation of myeloma with curcumin. *BMJ Case Rep*. 2017;2017. doi:10.1136/bcr-2016-218148

156. Dadhaniya P, Patel C, Muchhara J, et al. Safety assessment of a solid lipid curcumin particle preparation: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(8):1834-1842. doi:10.1016/j.fct.2011.05.001
157. Ganiger S, Malleshappa HN, Krishnappa H, Rajashekhar G, Ramakrishna Rao V, Sullivan F. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(1):64-69. doi:10.1016/j.fct.2006.07.016
158. Etoposide | C₂₉H₃₂O₁₃ - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36462>. Accessed January 13, 2020.
159. Karadeniz A, Alexie G, Greten HJ, Andersch K, Efferth T. Cytotoxicity of medicinal plants of the West-Canadian Gwich'in Native Americans towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2015;168:191-200. doi:10.1016/j.jep.2015.03.052
160. Ray LE. Podophyllum peltatum and observations on the Creek and Cherokee Indians: William Bartram's preservation of Native American pharmacology. *Yale J Biol Med.* 2009;82(1):25-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325943>. Accessed April 22, 2020.
161. Etoposide - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00773>. Accessed January 13, 2020.
162. Xiao B, Han MK, Viennois E, et al. Hyaluronic acid-functionalized polymeric nanoparticles for colon cancer-targeted combination chemotherapy. *Nanoscale.* 2015;7(42):17745-17755. doi:10.1039/c5nr04831a
163. Camptothecin | C₂₀H₁₆N₂O₄ - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24360>. Accessed January 13, 2020.
164. Ouyang M, Luo Z, Zhang W, et al. Protective effect of curcumin against irinotecan-induced intestinal mucosal injury via attenuation of NF-κB activation, oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Int J Oncol.* 2019;54(4):1376-1386. doi:10.3892/ijo.2019.4714
165. Irinotecan - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00762>. Accessed April 22, 2020.
166. Topotecan - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01030>. Accessed April 22, 2020.
167. Colchicine | C₂₂H₂₅NO₆ - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6167>. Accessed January 14, 2020.
168. Colchicine - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01394>. Accessed January 14, 2020.
169. Fürst R, Zündorf I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge

- into clinical progress. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:146832. doi:10.1155/2014/146832
170. Colchicine in the chemotherapy of cancer. *Br Med J.* 1950;2(4681):718-719. doi:10.1136/bmj.2.4681.718
171. Arrieta O, Rodriguez-Diaz JL, Rosas-Camargo V, et al. Colchicine delays the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis virus-related liver cirrhosis. *Cancer.* 2006;107(8):1852-1858. doi:10.1002/cncr.22198
172. Lin ZY, Wu CC, Chuang YH, Chuang WL. Anti-cancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 2013;93(8):323-328. doi:10.1016/j.lfs.2013.07.002
173. Lin Z-Y, Kuo C-H, Wu D-C, Chuang W-L. Anticancer effects of clinically acceptable colchicine concentrations on human gastric cancer cell lines. *Kaohsiung J Med Sci.* 2016;32(2):68-73. doi:10.1016/j.kjms.2015.12.006
174. Dvořák Z, Modrianský M, Pichard-Garcia L, et al. Colchicine down-regulates cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C9, and 3A4 in human hepatocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Pharmacol.* 2003;64(1):160-169. doi:10.1124/mol.64.1.160
175. Cytarabine | C9H13N3O5 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6253#section=Clinical-Trials>. Accessed January 20, 2020.
176. Visco C, Finotto S, Pomponi F, et al. The combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for heavily pretreated relapsed/refractory cytogenetically high-risk patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 2013;88(4):289-293. doi:10.1002/ajh.23391
177. Oxaliplatin, Fludarabine, Cytarabine and Rituximab in Richter's Syndrome, Refractory CLL and PLL - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00452374>. Accessed January 20, 2020.
178. Tsimberidou AM, Wierda WG, Wen S, et al. Phase I-II clinical trial of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab therapy in aggressive relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia or Richter syndrome. In: *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia.* Vol 13. NIH Public Access; 2013:568-574. doi:10.1016/j.clml.2013.03.012
179. Cytarabine - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00987>. Accessed April 22, 2020.
180. Fludarabine | C10H12FN5O4 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/657237>. Accessed January 20, 2020.
181. Kamburova EG, Koenen HJPM, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I. In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am J Transplant.* 2012;12(2):341-350. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03833.x

182. Rituximab - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00073>. Accessed January 20, 2020.
183. Ibrutinib | C₂₅H₂₄N₆O₂ - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24821094>. Accessed January 23, 2020.
184. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-763>. Accessed May 12, 2020.
185. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-497>. Accessed March 5, 2020.
186. Drexler HG (2010) *Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines. 2nd Edition. Braunschweig. - Open Access Library.* <http://www.oalib.com/references/10377178>. Accessed March 5, 2020.
187. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: Two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polymphocytoid transformation. *Leuk Res.* 1999;23(2):127-136. doi:10.1016/S0145-2126(98)00154-4
188. Henrich S, Christopherson RI. Multiple forms of nuclear p53 formed in human Raji and MEC1 cells treated with fludarabine [11]. *Leukemia.* 2008;22(3):657-660. doi:10.1038/sj.leu.2404929
189. Bosco R, Rabusin M, Voltan R, et al. Anti-leukemic activity of Dasatinib in both p53 wild-type and p53 mutated B malignant cells. *Invest New Drugs.* 2012;30(1):417-422. doi:10.1007/s10637-010-9564-6
190. Rasul E, Salamon D, Nagy N, et al. The MEC1 and MEC2 lines represent two CLL subclones in different stages of progression towards polymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0106008
191. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-67>. Accessed March 5, 2020.
192. Tert-butyl hydroperoxide | (CH₃)₃COOH - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6410#section=Metabolism-Metabolites>. Accessed March 28, 2020.
193. Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med.* 2000;6(7):833-836. doi:10.1038/77571
194. Rosén A, Bergh AC, Gogolák P, et al. Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection. *Oncoimmunology.* 2012;1(1):18-27. doi:10.4161/onci.1.1.18400
195. Hertlein E, Beckwith KA, Lozanski G, et al. Characterization of a New Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Line for Mechanistic In Vitro and In

- Vivo Studies Relevant to Disease. *PLoS One*. 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0076607
196. Sarkar R, Mukherjee A, Mukherjee S, Biswas R, Biswas J, Roy M. Curcumin augments the efficacy of antitumor drugs used in leukemia by modulation of heat shock proteins via HDAC6. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2014;33(3):247-263. doi:10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2014010913
 197. Shah K, Mirza S, Desai U, Jain N, Rawal R. Synergism of Curcumin and Cytarabine in the Down Regulation of Multi-Drug Resistance Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Anticancer Agents Med Chem*. 2016;16(1):128-135. doi:10.2174/1871520615666150817115718
 198. Pimentel-Gutiérrez HJ, Bobadilla-Morales L, Barba-Barba CC, et al. Curcumin potentiates the effect of chemotherapy against acute lymphoblastic leukemia cells via downregulation of NF- κ B. *Oncol Lett*. 2016;12(5):4117-4124. doi:10.3892/ol.2016.5217
 199. Su P, Yang Y, Wang G, Chen X, Ju Y. Curcumin attenuates resistance to irinotecan via induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2018;53(3):1343-1353. doi:10.3892/ijo.2018.4461
 200. Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. In: *Anticancer Research*. Vol 19. International Institute of Anticancer Research; 1999:3675-3680.
 201. Mehta K, Pantazis P, McQueen T, Aggarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs*. 1997;8(5):470-481. doi:10.1097/00001813-199706000-00010
 202. Chakrabarti R, Rawat PS, Cooke BM, Coppel RL, Patankar S. Cellular Effects of Curcumin on Plasmodium falciparum Include Disruption of Microtubules. *PLoS One*. 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0057302
 203. Gupta KK, Bharne SS, Rathinasamy K, Naik NR, Panda D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS J*. 2006;273(23):5320-5332. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05525.x
 204. Chakraborti S, Das L, Kapoor N, et al. Curcumin recognizes a unique binding site of tubulin. *J Med Chem*. 2011;54(18):6183-6196. doi:10.1021/jm2004046
 205. Voltan R, Rimondi E, Melloni E, et al. Ibrutinib synergizes with MDM-2 inhibitors in promoting cytotoxicity in B chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(43):70623-70638. doi:10.18632/oncotarget.12139
 206. Zauli G, Voltan R, Bosco R, et al. Dasatinib plus nutlin-3 shows synergistic antileukemic activity in both p53 wild-type and p53 mutated B chronic lymphocytic leukemias by inhibiting the Akt pathway. *Clin Cancer*

Res. 2011;17(4):762-770. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2572

207. Xu Y, Zhou X, Li Y, Zhang Y, Wang X. Suppression of minichromosome maintenance 7 expression sensitizes chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(5):1266-1274. doi:10.1080/10428194.2018.1523400
208. De La Fuente MT, Casanova B, Cantero E, et al. Involvement of p53 in $\alpha 4\beta 1$ integrin-mediated resistance of B-CLL cells to fludarabine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(3):708-712. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.054
209. Fahrman JF, Hardman WE. Omega 3 fatty acids increase the chemosensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids Health Dis*. 2013;12(1). doi:10.1186/1476-511X-12-36
210. De La Fuente MT, Casanova B, Moyano J V., et al. Engagement of $\alpha 4\beta 1$ integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol*. 2002;71(3):495-502. doi:10.1189/jlb.71.3.495
211. Famulski KS, Macdonald D, Paterson MC, Sikora E. Activation of a low pH-dependent nuclease by apoptotic agents. *Cell Death Differ*. 1999;6(3):281-289. doi:10.1038/sj.cdd.4400495
212. Saleh EM, El-awady RA, Eissa NA, Abdel-Rahman WM. Antagonism between curcumin and the topoisomerase II inhibitor etoposide: A study of DNA damage, cell cycle regulation and death pathways. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(11):1058-1071. doi:10.4161/cbt.21078
213. Ramachandran C, Nair SM, Escalon E, Melnick SJ. Potentiation of etoposide and temozolomide cytotoxicity by curcumin and turmeric force™ in brain tumor cell lines. *J Complement Integr Med*. 2012;9:Article 20. doi:10.1515/1553-3840.1614
214. Sreenivasan S, Krishnakumar S. Synergistic effect of curcumin in combination with anticancer agents in human retinoblastoma cancer cell lines. *Curr Eye Res*. 2015;40(11):1153-1165. doi:10.3109/02713683.2014.987870
215. Yu LL, Wu JG, Dai N, Yu HG, Si JM. Curcumin reverses chemoresistance of human gastric cancer cells by downregulating the NF- κ B transcription factor. *Oncol Rep*. 2011;26(5):1197-1203. doi:10.3892/or.2011.1410
216. Depeille P, Cuq P, Passagne I, Evrard A, Vian L. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. *Br J Cancer*. 2005;93(2):216-223. doi:10.1038/sj.bjc.6602681
217. Papiez MA. The influence of curcumin on the action of etoposide in a rat acute myeloid leukemia cell line. *Folia Med Cracov*. 2013;53(2):61-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858458>. Accessed April 15, 2020.
218. Papiez MA. The influence of curcumin and (-)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow

- cells of male rats. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36(1):93-101.
doi:10.3109/01480545.2012.726626
219. Neerati P, Sudhakar YA, Kanwar JR. Curcumin Regulates Colon Cancer by Inhibiting P-Glycoprotein in In-situ Cancerous Colon Perfusion Rat Model. *J Cancer Sci Ther.* 2013;5:313.
 220. Zhao Q, Guan J, Qin Y, et al. Curcumin sensitizes lymphoma cells to DNA damage agents through regulating Rad51-dependent homologous recombination. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:115-119.
doi:10.1016/j.biopha.2017.09.078
 221. Madamsetty VS, Pal K, Keshavan S, et al. Development of multi-drug loaded PEGylated nanodiamonds to inhibit tumor growth and metastasis in genetically engineered mouse models of pancreatic cancer. *Nanoscale.* 2019;11(45):22006-22018. doi:10.1039/c9nr05478b
 222. Xiao H, Guo Y, Liu H, et al. Structure-based design of charge-conversional drug self-delivery systems for better targeted cancer therapy. *Biomaterials.* 2020;232:119701.
doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119701
 223. Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orlowski RZ. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62(13):3868-3875.
 224. Ciftci O, Turkmen NB, Taslidere A. Curcumin protects heart tissue against irinotecan-induced damage in terms of cytokine level alterations, oxidative stress, and histological damage in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(8):783-791. doi:10.1007/s00210-018-1495-3
 225. Güçlü O, Doğanlar O, Yüksel V, Doğanlar ZB. FOLFIRI-Mediated Toxicity in Human Aortic Smooth Muscle Cells and Possible Amelioration with Curcumin and Quercetin. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(2):139-154.
doi:10.1007/s12012-019-09541-w
 226. Singh U, Quintanilla RH, Grecian S, Gee KR, Rao MS, Lakshmi pathy U. Novel Live Alkaline Phosphatase Substrate for Identification of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports.* 2012;8(3):1021-1029.
doi:10.1007/s12015-012-9359-6
 227. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
 228. Martí M, Mulero L, Pardo C, et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2013;8(2):223-253. doi:10.1038/nprot.2012.154
 229. Hassan HE, Carlson S, Abdallah I, Buttolph T, Glass KC, Fandy TE. Curcumin and dimethoxycurcumin induced epigenetic changes in leukemia cells. *Pharm Res.* 2015;32(3):863-875. doi:10.1007/s11095-014-1502-4
 230. Sun C, Liu X, Chen Y, Liu F. Anticancer effect of curcumin on human B cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.*

2005;25(4):404-407. doi:10.1007/bf02828208

231. Qiao Q, Jiang Y, Li G. Curcumin enhances the response of non-Hodgkin's lymphoma cells to ionizing radiation through further induction of cell cycle arrest at the G2/M phase and inhibition of mTOR phosphorylation. *Oncol Rep.* 2013;29(1):380-386. doi:10.3892/or.2012.2091
232. Li N, Wen S, Chen G, Wang S. Antiproliferative potential of piperine and curcumin in drug-resistant human leukemia cancer cells are mediated via autophagy and apoptosis induction, S-phase cell cycle arrest and inhibition of cell invasion and migration. *J BUON.* 2020;25(1):401-406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32277661>. Accessed April 24, 2020.
233. Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, Shankar S. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). *Cell Cycle.* 2007;6(23):2953-2961. doi:10.4161/cc.6.23.4951
234. Lu JJ, Cai YJ, Ding J. Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells. *Mol Cell Biochem.* 2011;354(1-2):247-252. doi:10.1007/s11010-011-0824-3
235. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct.* 2002;27(6):421-429. doi:10.1247/csf.27.421
236. Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig C, Bayraktar O, Gozuacik D, Kutlu O. Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci.* 2019;134:116-137. doi:10.1016/j.ejps.2019.04.011
237. Aki T, Nara A, Uemura K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biol Toxicol.* 2012;28(3):125-131. doi:10.1007/s10565-012-9212-3
238. Deng S, Shanmugam MK, Kumar AP, Yap CT, Sethi G, Bishayee A. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. *Cancer.* 2019;125(8):1228-1246. doi:10.1002/cncr.31978
239. Shubin A V., Demidyuk I V., Komissarov AA, Rafieva LM, Kostrov S V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget.* 2016;7(34):55863-55889. doi:10.18632/oncotarget.10150
240. Fumitremorgin C | C22H25N3O3 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fumitremorgin-C>. Accessed May 10, 2020.
241. Allen JD, Van Loevezijn A, Lakhai JM, et al. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(6):417-425.
242. Chen C, Tang Q, Zhang Y, Yu M, Jing W, Tian W. Physioxia: A more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1). doi:10.1186/s13287-018-

0891-4

243. Sakulterdkiat T, Srisomsap C, UDOMSANGPETCH R, SVASTI J, LIRDPRAPAMONGKOL K. Curcumin Resistance Induced by Hypoxia in HepG2 Cells Is Mediated by Multidrug-resistance-associated Proteins. *Anticancer Res.* 2012;32(12):5337-5342.

Material supplementari

Taula suplementària 1: Resultats numèrics dels efectes de la curcumina sobre la integritat de membrana de les línies cel·lulars.

| | Concentració curcumina | Integritat de membrana (%) | σ | T-Student |
|------|------------------------|----------------------------|----------|---------------------------|
| I83 | | | | |
| 24h | 0 μ M | 96,38 | 0,17 | 1,64x10 ⁻⁵ *** |
| | 5 μ M | 93,73 | 0,07 | |
| 48h | 0 μ M | 97,37 | 0,21 | 0,0005** |
| | 5 μ M | 93,31 | 0,66 | |
| 72h | 0 μ M | 96,68 | 0,30 | 0,04* |
| | 5 μ M | 95,95 | 0,29 | |
| Mec1 | | | | |
| 24h | 0 μ M | 83,89 | 1,37 | 0,009* |
| | 5 μ M | 78,47 | 1,44 | |
| 48h | 0 μ M | 91,46 | 0,47 | 0,001** |
| | 5 μ M | 88,38 | 0,42 | |
| 72h | 0 μ M | 87,93 | 1,29 | 0,17 |
| | 5 μ M | 86,42 | 0,89 | |
| EHEB | | | | |
| 24h | 0 μ M | 79,68 | 0,78 | 0,006* |
| | 5 μ M | 75,58 | 1,08 | |
| 48h | 0 μ M | 78,87 | 0,88 | 0,00052** |
| | 5 μ M | 73,40 | 0,29 | |
| 72h | 0 μ M | 76,20 | 1,16 | 0,001** |
| | 5 μ M | 68,65 | 1,01 | |

A la columna T-Student s'indica el nivell de significació. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula suplementària 2: Resultats numèrics dels efectes de la curcumina sobre la proliferació de les línies cel·lulars.

| | Concentració curcumina | Concentració cel·lular (cèl·lules/ μ L) | σ | T-Student |
|------|------------------------|---|----------|---------------------------|
| I83 | | | | |
| 24h | 0 μ M | 122,96 | 1,57 | 4,09x10 ⁻⁵ *** |
| | 5 μ M | 102,57 | 0,92 | |
| 48h | 0 μ M | 329,69 | 3,15 | 1,89x10 ⁻⁵ *** |
| | 5 μ M | 202,95 | 8,73 | |
| 72h | 0 μ M | 731,92 | 15,27 | 4,7x10 ⁻⁵ *** |
| | 5 μ M | 513,05 | 13,16 | |
| Mec1 | | | | |
| 24h | Cur0 μ M | 80,77 | 3,91 | 0,0098* |
| | Cur5 μ M | 64,94 | 4,45 | |
| 48h | Cur0 μ M | 199,23 | 19,18 | 0,222 |
| | Cur5 μ M | 182,97 | 3,51 | |
| 72h | Cur0 μ M | 395,39 | 19,85 | 0,001** |
| | Cur5 μ M | 279,52 | 13,81 | |
| EHEB | | | | |
| 24h | Cur0 μ M | 78,03 | 0,46 | 0,0013** |
| | Cur5 μ M | 75,10 | 0,43 | |
| 48h | Cur0 μ M | 89,42 | 0,46 | 0,00012*** |
| | Cur5 μ M | 77,53 | 1,32 | |
| 72h | Cur0 μ M | 102,38 | 5,06 | 0,007* |
| | Cur5 μ M | 83,02 | 4,27 | |

A la columna T-Student s'indica el nivell de significació. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula suplementària 3: Resultats numèrics dels efectes dels diferents fàrmacs i la seva combinació amb curcumina sobre la integritat de membrana de les línies cel·lulars.

| | Concentració | I83 | | | Mec1 | | | EHEB | | |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------|---------------------------|----------------------------|----------|---------------------------|----------------------------|----------|---------------------------|
| | | Integritat de membrana (%) | σ | T-Student | Integritat de membrana (%) | σ | T-Student | Integritat de membrana (%) | σ | T-Student |
| Etopòsid 24h | 0 μ M | 96,38 | 0,17 | | 83,89 | 1,37 | | 79,68 | 0,78 | |
| | 0,1 μ M | 96,19 | 0,22 | 0,3 | 80,72 | 1,03 | 0,033* | 76,80 | 0,61 | 0,007* |
| | 0,1 μ M+Cur5 μ M | 92,83 | 0,15 | 2,46x10 ⁻⁵ *** | 77,00 | 2,01 | 0,046* | 75,12 | 0,94 | 0,06 |
| 48h | 0 μ M | 97,37 | 0,21 | | 91,46 | 0,47 | | 78,87 | 0,88 | |
| | 0,1 μ M | 97,13 | 0,18 | 0,2 | 88,28 | 1,55 | 0,027* | 74,90 | 1,40 | 0,014* |
| | 0,1 μ M+Cur5 μ M | 91,45 | 0,69 | 0,00016*** | 86,66 | 1,24 | 0,234 | 70,79 | 0,82 | 0,01* |
| 72h | 0 μ M | 96,68 | 0,3 | | 87,93 | 1,29 | | 76,20 | 1,16 | |
| | 0,1 μ M | 95,98 | 0,33 | 0,05 | 87,83 | 1,72 | 0,94 | 69,50 | 0,49 | 0,00076** |
| | 0,1 μ M+Cur5 μ M | 92,96 | 0,27 | 0,00025*** | 78,17 | 2,47 | 0,0051* | 62,29 | 0,42 | 4,14x10 ⁻⁵ *** |
| Camptotecina 24h | 0 μ M | 96,38 | 0,17 | | 83,89 | 1,37 | | 79,68 | 0,78 | |
| | 0,005 μ M | 95,74 | 0,15 | 0,0079* | 83,45 | 0,11 | 0,6 | 75,37 | 0,72 | 0,002** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 91,61 | 0,16 | 4,87x10 ⁻⁶ *** | 79,29 | 1,53 | 0,0093* | 73,77 | 0,75 | 0,057 |
| 48h | 0 μ M | 97,37 | 0,21 | | 91,46 | 0,47 | | 78,87 | 0,88 | |
| | 0,005 μ M | 96,12 | 0,37 | 0,00698* | 82,90 | 2,61 | 0,00504* | 65,11 | 1,56 | 0,000186*** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 85,19 | 0,6 | 1,14x10 ⁻⁵ *** | 83,45 | 0,39 | 0,74 | 67,62 | 1,13 | 0,087 |
| 72h | 0 μ M | 96,68 | 0,3 | | 87,93 | 1,29 | | 76,20 | 1,16 | |
| | 0,005 μ M | 94,16 | 0,1 | 0,00016*** | 79,58 | 0,76 | 0,0006** | 58,59 | 0,95 | 3,4x10 ⁻⁵ *** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 81,56 | 4,81 | 0,01* | 70,26 | 2,89 | 0,0057* | 56,87 | 1,19 | 0,12 |
| Colquicina 24h | 0 μ M | 96,38 | 0,17 | | 83,89 | 1,37 | | 79,68 | 0,78 | |
| | 0,005 μ M | 96,33 | 0,11 | 0,686 | 87,62 | 0,34 | 0,01* | 77,64 | 0,80 | 0,034* |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 91,04 | 0,22 | 3,17x10 ⁻⁶ *** | 77,69 | 1,31 | 0,00022*** | 74,49 | 1,03 | 0,014* |
| 48h | 0 μ M | 97,37 | 0,21 | | 87,21 | 1,12 | | 78,87 | 0,88 | |
| | 0,005 μ M | 95,32 | 0,08 | 0,0001*** | 78,82 | 0,73 | 0,0004*** | 68,45 | 2,13 | 0,0014 |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 81,49 | 1,48 | 8,54x10 ⁻⁵ *** | 49,67 | 1,83 | 1,38x10 ⁻⁵ *** | 66,10 | 0,13 | 0,13 |
| 72h | 0 μ M | 96,68 | 0,30 | | 92,20 | 1,55 | | 76,20 | 1,16 | |
| | 0,005 μ M | 89,65 | 1,51 | 0,00138** | 73,41 | 1,18 | 7,5x10 ⁻⁵ *** | 57,58 | 0,85 | 2,3x10 ⁻⁵ *** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 83,93 | 0,55 | 0,0035** | 46,98 | 3,39 | 0,0002*** | 52,61 | 1,45 | 0,0069* |
| Citarabina 24h | 0 μ M | 95,91 | 0,09 | | 76,03 | 0,71 | | 75,49 | 1,43 | |
| | 0,01 μ M | 93,82 | 0,68 | 0,006* | 70,65 | 1,14 | 0,0023** | 75,33 | 1,02 | 0,88 |
| | 0,01 μ M+Cur5 μ M | 92,26 | 0,87 | 0,0698 | 65,00 | 1,13 | 0,0037** | 73,30 | 0,81 | 0,055 |
| 48h | 0 μ M | 97,11 | 0,21 | | 87,33 | 0,79 | | 77,90 | 0,79 | |
| | 0,01 μ M | 95,32 | 0,26 | 0,00072** | 85,00 | 0,86 | 0,026* | 78,83 | 0,18 | 0,12 |
| | 0,01 μ M+Cur5 μ M | 93,55 | 0,89 | 0,03* | 80,49 | 1,21 | 0,0063* | 76,01 | 0,74 | 0,003** |
| 72h | 0 μ M | 97,57 | 0,12 | | 86,49 | 0,54 | | 78,80 | 1,21 | |
| | 0,01 μ M | 95,01 | 0,39 | 0,0004*** | 87,53 | 1,41 | 0,299 | 77,04 | 2,91 | 0,387 |
| | 0,01 μ M+Cur5 μ M | 93,53 | 0,32 | 0,0069* | 84,92 | 1,28 | 0,076 | 75,27 | 2,16 | 0,44 |
| Fludarabina 24h | 0 μ M | 95,91 | 0,09 | | 76,03 | 0,71 | | 75,49 | 1,43 | |
| | 10 μ M | 95,82 | 0,21 | 0,5 | 70,58 | 2,83 | 0,032* | 75,21 | 0,69 | 0,78 |
| | 10 μ M+Cur5 μ M | 95,12 | 0,15 | 0,009* | 64,54 | 1,99 | 0,0387* | 73,09 | 1,22 | 0,058 |
| 48h | 0 μ M | 97,11 | 0,21 | | 87,33 | 0,79 | | 77,90 | 0,79 | |
| | 10 μ M | 95,22 | 0,19 | 0,00032*** | 81,80 | 1,12 | 0,002** | 76,63 | 0,88 | 0,136 |
| | 10 μ M+Cur5 μ M | 94,33 | 0,19 | 0,0049** | 75,94 | 2,79 | 0,0279* | 74,88 | 0,87 | 0,071 |
| 72h | 0 μ M | 97,57 | 0,12 | | 86,49 | 0,54 | | 78,80 | 1,21 | |
| | 10 μ M | 85,05 | 1,30 | 7,69x10 ⁻⁵ *** | 85,52 | 0,52 | 0,0898 | 77,11 | 0,28 | 0,077 |
| | 10 μ M+Cur5 μ M | 82,19 | 1,65 | 0,078 | 80,50 | 1,38 | 0,004** | 72,76 | 0,95 | 0,0016** |

A la columna T-Student s'indica el nivell de significació del tractament amb fàrmac respecte al control (casella central) i de la combinació del fàrmac amb curcumina respecte al fàrmac sol (casella inferior). * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula suplementària 4: Resultats numèrics dels efectes dels diferents fàrmacs i la seva combinació amb curcumina sobre la proliferació de les línies cel·lulars.

| | Concentració | I83 | | | Mec1 | | | EHEB | | |
|---------------------|----------------------------|---|----------|----------------------------|---|----------|--------------------------|---|----------|---------------------------|
| | | Concentració cel·lular (cèl·lules/ μ L) | σ | T-Student | Concentració cel·lular (cèl·lules/ μ L) | σ | T-Student | Concentració cel·lular (cèl·lules/ μ L) | σ | T-Student |
| Etopòsid 24h | 0 μ M | 122,96 | 1,57 | | 80,77 | 3,91 | | 78,03 | 0,46 | |
| | 0,1 μ M | 111,73 | 0 | 0,00024*** | 74,15 | 5,32 | 0,157 | 72,03 | 0,30 | 4,7x10 ⁻⁵ *** |
| | 0,1 μ M+Cur5 μ M | 90,09 | 0,41 | 8,25x10 ⁻⁶ *** | 46,26 | 5,85 | 0,0036** | 67,66 | 1,14 | 0,003** |
| 48h | 0 μ M | 329,69 | 3,15 | | 199,23 | 19,18 | | 89,42 | 0,46 | |
| | 0,1 μ M | 281,8 | 6,97 | 0,00041*** | 160,14 | 5,81 | 0,0278* | 74,87 | 2,44 | 0,0005** |
| | 0,1 μ M+Cur5 μ M | 161,3 | 1,3 | 7,94x10 ⁻⁶ *** | 117,00 | 23,11 | 0,035* | 67,81 | 1,29 | 0,01* |
| 72h | 0 μ M | 731,92 | 15,27 | | 395,39 | 19,85 | | 102,38 | 5,06 | |
| | 0,1 μ M | 618,69 | 10,93 | 0,00048*** | 207,58 | 26,49 | 0,0006** | 72,16 | 2,09 | 0,00067** |
| | 0,1 μ M+Cur5 μ M | 382,75 | 18,25 | 4,33x10 ⁻⁵ *** | 111,46 | 29,57 | 0,014* | 64,87 | 0,95 | 0,005* |
| Camptotecina 24h | 0 μ M | 122,96 | 1,57 | | 80,77 | 3,91 | | 78,03 | 0,46 | |
| | 0,005 μ M | 93,48 | 1,59 | 2,14x10 ⁻⁵ *** | 63,28 | 6,23 | 0,015* | 67,28 | 1,11 | 0,0001*** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 74,72 | 0,7 | 4,79x10 ⁻⁵ *** | 44,20 | 8,88 | 0,038* | 67,34 | 0,45 | 0,93 |
| 48h | 0 μ M | 329,69 | 3,15 | | 199,23 | 19,18 | | 89,42 | 0,46 | |
| | 0,005 μ M | 209,33 | 9,29 | 2,898x10 ⁻⁵ *** | 109,94 | 10,48 | 0,002** | 69,16 | 1,98 | 6,57x10 ⁻⁵ |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 106,66 | 3,71 | 5,878x10 ⁻⁵ *** | 75,24 | 10,19 | 0,015* | 68,30 | 2,07 | 0,63 |
| 72h | 0 μ M | 731,92 | 15,27 | | 395,39 | 19,85 | | 102,38 | 5,06 | |
| | 0,005 μ M | 434,92 | 9,46 | 8,85x10 ⁻⁶ *** | 152,73 | 33,59 | 0,0004*** | 65,36 | 0,43 | 0,0002*** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 163,7 | 64,53 | 0,00197** | 86,14 | 9,99 | 0,03* | 65,58 | 0,86 | 0,71 |
| Colquicina 24h | 0 μ M | 122,96 | 1,57 | | 80,77 | 3,91 | | 78,03 | 0,46 | |
| | 0,005 μ M | 117,88 | 0,40 | 0,0055* | 71,85 | 11,52 | 0,273 | 72,47 | 0,45 | 0,00012*** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 95,10 | 1,32 | 8,78x10 ⁻⁶ *** | 60,30 | 3,96 | 0,176 | 70,31 | 2,35 | 0,19 |
| 48h | 0 μ M | 329,69 | 3,15 | | 264,45 | 7,19 | | 89,42 | 0,46 | |
| | 0,005 μ M | 301,61 | 6,90 | 0,003** | 150,86 | 10,64 | 0,0001*** | 79,27 | 1,10 | 0,00012*** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 153,78 | 8,81 | 2,16x10 ⁻⁵ *** | 86,80 | 3,58 | 0,00059** | 71,21 | 1,92 | 0,003** |
| 72h | 0 μ M | 731,92 | 15,27 | | 583,28 | 25,61 | | 102,38 | 5,06 | |
| | 0,005 μ M | 570,67 | 64,90 | 0,0138* | 351,39 | 16,69 | 0,00019*** | 78,95 | 0,48 | 0,001** |
| | 0,005 μ M+Cur5 μ M | 330,42 | 19,31 | 0,00356** | 106,38 | 12,93 | 3,6x10 ⁻⁵ *** | 71,18 | 0,51 | 4,19x10 ⁻⁵ *** |
| Citarabina 24h | 0 μ M | 129,88 | 1,69 | | 74,19 | 5,82 | | 81,52 | 0,47 | |
| | 0,01 μ M | 78,64 | 0,71 | 1,08x10 ⁻⁶ *** | 62,65 | 10,38 | 0,168 | 77,37 | 1,23 | 0,0055* |
| | 0,01 μ M+Cur5 μ M | 77,93 | 1,14 | 0,413 | 49,70 | 3,25 | 0,108 | 75,56 | 0,79 | 0,099 |
| 48h | 0 μ M | 324,46 | 8,10 | | 183,05 | 18,76 | | 92,62 | 5,65 | |
| | 0,01 μ M | 160,87 | 1,97 | 4,47x10 ⁻⁶ *** | 155,77 | 8,69 | 0,084 | 90,76 | 1,03 | 0,6 |
| | 0,01 μ M+Cur5 μ M | 143,25 | 3,34 | 0,001** | 114,50 | 10,62 | 0,0065* | 81,78 | 1,04 | 0,00044*** |
| 72h | 0 μ M | 620,58 | 42,57 | | 480,24 | 13,10 | | 106,51 | 2,23 | |
| | 0,01 μ M | 310,90 | 2,78 | 0,00023*** | 379,96 | 11,12 | 0,00054** | 100,57 | 10,63 | 0,4 |
| | 0,01 μ M+Cur5 μ M | 283,69 | 17,16 | 0,0535 | 285,87 | 8,17 | 0,00029*** | 91,25 | 1,47 | 0,2 |
| Fludarabina 24h | 0 μ M | 129,88 | 1,69 | | 74,19 | 5,82 | | 81,52 | 0,47 | |
| | 10 μ M | 114,09 | 2,00 | 0,00047*** | 67,46 | 2,15 | 0,134 | 76,24 | 1,77 | 0,0075* |
| | 10 μ M+Cur5 μ M | 108,55 | 2,98 | 0,056 | 59,48 | 1,03 | 0,0044** | 75,58 | 1,07 | 0,61 |
| 48h | 0 μ M | 324,46 | 8,10 | | 183,05 | 18,76 | | 92,62 | 5,65 | |
| | 10 μ M | 160,42 | 9,89 | 2,42x10 ⁻⁵ *** | 119,21 | 12,26 | 0,0078* | 87,92 | 2,14 | 0,25 |
| | 10 μ M+Cur5 μ M | 145,44 | 8,13 | 0,11 | 75,50 | 4,82 | 0,0045** | 81,91 | 1,84 | 0,021* |
| 72h | 0 μ M | 620,58 | 42,57 | | 480,24 | 13,10 | | 106,51 | 2,23 | |
| | 10 μ M | 205,51 | 3,21 | 7,288x10 ⁻⁵ *** | 260,00 | 10,14 | 2,1x10 ⁻⁵ *** | 103,83 | 2,26 | 0,22 |
| | 10 μ M+Cur5 μ M | 177,00 | 1,57 | 0,00016*** | 174,43 | 11,41 | 0,00063** | 91,04 | 1,03 | 0,00087** |

A la columna T-Student s'indica el nivell de significació del tractament amb fàrmac respecte al control (casella central) i de la combinació del fàrmac amb curcumina respecte al fàrmac sol (casella inferior). * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

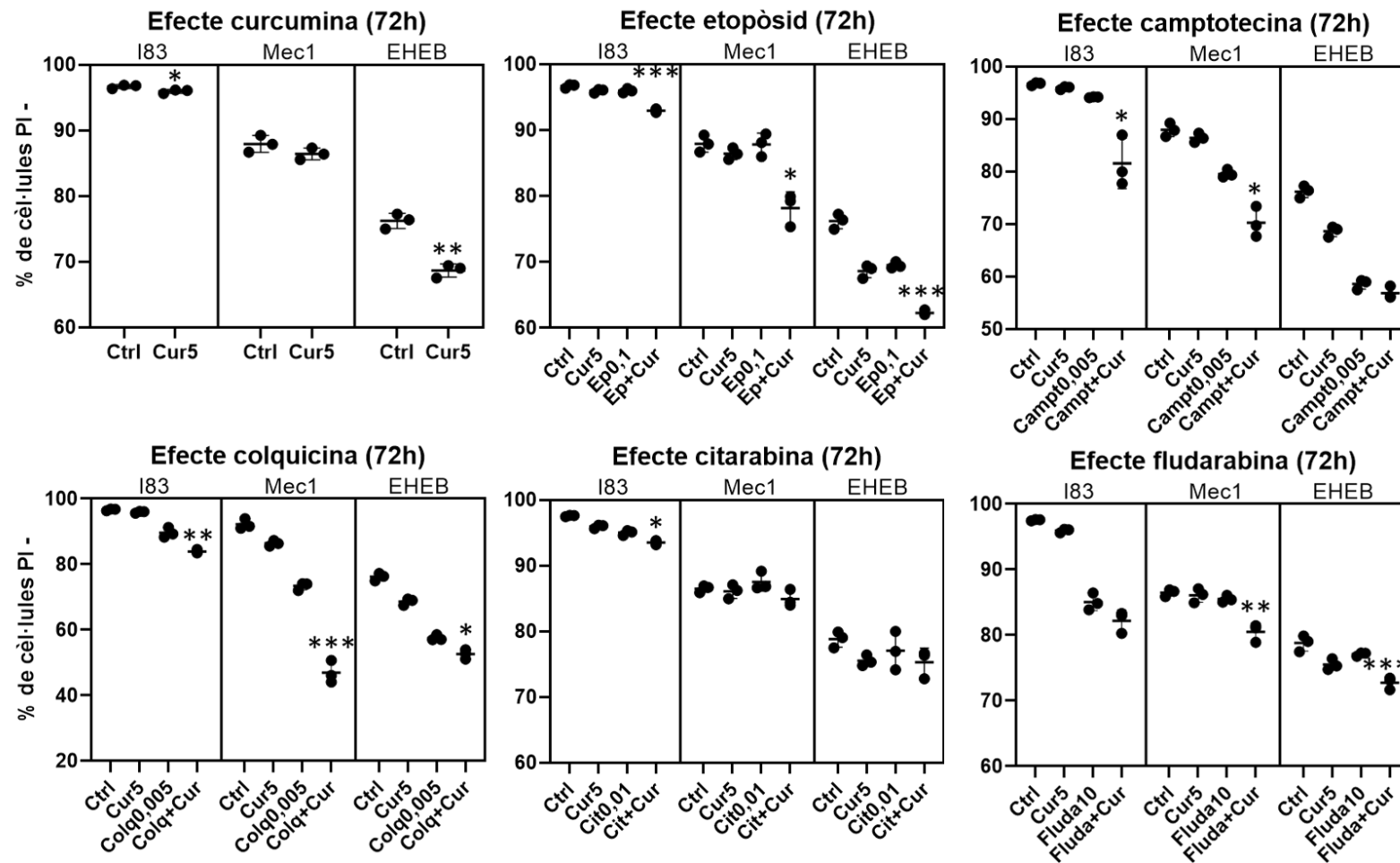


Figura suplementària 1: Resum dels efectes dels diferents fàrmacs testats en les línies cel·lulars, combinats o no amb la curcumina, sobre integritat de la membrana cel·lular a les 72 hores. S'han marcat amb asteriscs els casos en què la curcumina potenciava significativament l'efecte del fàrmac. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$.

Taula suplementària 5: Resum del sinergisme de la curcumina amb els diferents fàrmacs testats en les línies cel·lulars.

| | I83 | Mec1 | EHEB |
|-------|------|------|------|
| Ep | 0,98 | 0,91 | 0,99 |
| Campt | 0,87 | 0,90 | 1,08 |
| Colq | 0,95 | 0,68 | 1,01 |
| Cit | 1,00 | 0,97 | 1,02 |
| Fluda | 0,98 | 0,95 | 0,98 |

Taula suplementària 6: Resum dels efectes citomorfològics produïts pels diferents fàrmacs i la curcumina.

| | Ctrl | Cur | Ep | Campt | Colq | Cit | Fluda |
|--|-------------|------|------------------|------------------|------------------|-------------|------------|
| Més mida, deformació de nucli i polinucleació | | I83 | I83, Mec1 i EHEB | I83, Mec1 i EHEB | EHEB | I83 | I83 i EHEB |
| Deformacions membrana cel·lular | Mec1 i EHEB | | | | | | I83 |
| Fragmentació nucli | | Mec1 | | | I83, Mec1 i EHEB | Mec1 | Mec1 |
| Vesícules | I83 i EHEB | | I83 | I83 | | | I83 |
| Vacuolització | | | EHEB | EHEB | EHEB | Mec1 i EHEB | EHEB |
| La curcumina anticipa els efectes | | | Mec1 i EHEB | EHEB | I83 i Mec1 | Mec1 | Mec1 |

Taula suplementària 7: Resum dels efectes de la curcumina i els diferents fàrmacs, sols i en combinació amb la curcumina, sobre les fases del cycle cel·lular.

| Tractament | I83 | | Mec1 | | EHEB | |
|---------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | S | G2M | S | G2M | S | G2M |
| Curcumina | | | | | | |
| 24h | +++ | | ++ | | | |
| 48h | - | | - | | | |
| 72h | -- | | + | | + | |
| Etopòsid | | | | | | |
| 24h | | ++ | | ++ | | |
| 48h | | ++ | --- | ++ | | + |
| 72h | | | - | + | | ++ |
| + Curcumina | | | | | | |
| 24h | | | +++ | --- | | |
| 48h | | | | | | |
| 72h | | | ++ | | ++ | - |
| Camptotecina | | | | | | |
| 24h | | +++ | ++ | + | | |
| 48h | | ++ | ++ | ++ | ++ | |
| 72h | | ++ | +++ | +++ | ++ | + |
| + Curcumina | | | | | | |
| 24h | - | ++ | | - | | |
| 48h | | | | | | |
| 72h | | | | | | |
| Colquicina | | | | | | |
| 24h | +++ | ++ | | ++ | - | |
| 48h | +++ | | | ++ | + | |
| 72h | + | + | + | +++ | + | |
| + Curcumina | | | | | | |
| 24h | ++ | | | | | |
| 48h | -- | | | + | | |
| 72h | | | | | + | |
| Citarabina | | | | | | |
| 24h | +++ | + | ++ | | | |
| 48h | +++ | + | | | | - |
| 72h | | + | ++ | | | |
| + Curcumina | | | | | | |
| 24h | | - | ++ | - | | - |
| 48h | + | -- | - | | | |
| 72h | | | +++ | - | | |
| Fludarabina | | | | | | |
| 24h | +++ | -- | + | - | | |
| 48h | // | // | | | | - |
| 72h | // | // | +++ | | | |
| + Curcumina | | | | | | |
| 24h | ++ | - | ++ | -- | | |
| 48h | // | // | | + | | |
| 72h | // | // | | - | | |

S'indica si es va produir un increment (+) o una disminució (-) del percentatge de cèl·lules en la fase indicada. El nivell de significació per cada tractament es va calcular comparant amb el control, en el cas de la curcumina i els fàrmacs; i amb el fàrmac sol, en el cas de la combinació del fàrmac en qüestió amb la curcumina. + $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$. L'efecte de la fludarabina en I83 no es va poder mesurar a les 48 i 72 hores a causa de l'elevada disrupció del cycle que es va produir (//).

Taula suplementària 8: Resultats numèrics dels efectes de la curcumina i diferents fàrmacs i la seva combinació amb curcumina sobre diferents subpoblacions de cèl·lules dels cultius primaris.

| Mostra | Tractament | % de cèl·lules | | | Temps d'incubació |
|-----------------------|-------------|----------------|--------------|---------------------|-------------------|
| | | PI - | CD5 + CD19 + | CD5 + CD19 + APLS + | |
| CLL17 | Ctrl | 48,382 | 1,246 | 96,154 | 96h |
| | Cur5 | 30,323 | 2,356 | 96 | |
| | Ibrutinib10 | 29,156 | 1,418 | 88,732 | |
| | Ibru+Cur | 12,372 | 0,987 | 60 | |
| CLL18 | Ctrl | 33,975 | 0,497 | 100 | 96h |
| | Cur5 | 16,82 | 0,158 | 100 | |
| | Ritux10 | 11,649 | 0,895 | 0 | |
| | Ritux+Cur | 14,125 | 0,699 | 100 | |
| CLL20 | Ctrl | 53,805 | 31,872 | 91,704 | 96h |
| | Cur5 | 33,601 | 22,767 | 85,802 | |
| | Ritux10 | 54,086 | 31,919 | 90,422 | |
| | Ritux+Cur | 31,829 | 21,345 | 81,922 | |
| CLL21 (Pacient 21) | Ctrl | 68,43 | 32,484 | 94,25 | 72h |
| | Cur5 | 44,955 | 28,034 | 88,361 | |
| | Ibrutinib10 | 50,573 | 16,311 | 72,428 | |
| | Ibru+Cur | 21,699 | 5,766 | 26,446 | |
| CLL28 | Ctrl | 13,081 | 30,703 | 74,046 | 72h |
| | Cur5 | 10,87 | 33,003 | 70,155 | |
| | Fluda10 | 5,497 | 60,788 | 42,473 | |
| | Fluda+Cur | 4,393 | 43,076 | 39,666 | |
| CLL29 | Ctrl | 22,657 | 67,293 | 43,267 | 72h |
| | Cur5 | 21,542 | 64,51 | 43,142 | |
| | Fluda10 | 10,506 | 64,791 | 19,178 | |
| | Fluda+Cur | 11,654 | 64,256 | 13,743 | |
| CLL30 (Pacient 21) | Ctrl | 54,008 | 29,178 | 98,354 | 96h |
| | Cur5 | 28,572 | 19,976 | 88,254 | |
| | Ibru10 | 32,717 | 6,836 | 68,008 | |
| | Ibru+Cur | 9,837 | 4,097 | 0,289 | |
| CLL31 (Pacient 29) | Ctrl | 63,678 | 96,975 | 96,609 | 96h |
| | Cur5 | 48,452 | 97,387 | 93,463 | |
| | Fluda10 | 14,702 | 97,954 | 79,674 | |
| | Fluda+Cur | 16,818 | 96,441 | 67,742 | |
| | Ctrl | 63,678 | 96,975 | 96,609 | |
| | Cur5 | 48,452 | 97,387 | 93,463 | |
| | Ritux10 | 57,613 | 98,761 | 94,145 | |
| | Ritux+Cur | 51,634 | 97,098 | 65,606 | |
| CLL32 | Ctrl | 46,378 | 70,509 | 97,801 | 72h |
| | Cur5 | 41,682 | 66,942 | 96,602 | |
| | Fluda10 | 12,94 | 67,449 | 83,632 | |
| | Fluda+Cur | 9,127 | 57,341 | 72,459 | |
| CLL33 | Ctrl | 29,975 | 28,385 | 96,563 | 120h |
| | Cur5 | 12,085 | 14,43 | 51,401 | |
| | Ibru10 | 6,691 | 10,731 | 62,571 | |
| | Ibru+Cur | 1,464 | 20,256 | 9,091 | |
| CLL34 | Ctrl | 37,289 | 3,323 | 92,661 | 120h |
| | Cur5 | 12,622 | 2,829 | 82,857 | |
| | Ibru10 | 14,47 | 1,24 | 7,692 | |
| | Ibru+Cur | 4,495 | 1,064 | 0 | |
| CLL35 | Ctrl | 33,425 | 43,738 | 91,773 | 120h |
| | Cur5 | 13,835 | 44,055 | 88,494 | |
| | Ritux10 | 34,304 | 41,898 | 84,178 | |
| | Ritux+Cur | 10,739 | 44,776 | 79,371 | |
| CLL36 | Ctrl | 33,385 | 45,241 | 38,047 | 72h |
| | Cur5 | 11,495 | 22,923 | 75 | |
| | Fluda10 | 5,507 | 41,805 | 45,083 | |
| | Fluda+Cur | 2,255 | 32,929 | 35,787 | |
| CLL37 | Ctrl | 57,348 | 59,767 | 99,172 | 72h |
| | Cur5 | 37,935 | 60,562 | 96,856 | |
| | Fluda10 | 3,329 | 12,416 | 64,315 | |
| | Fluda+Cur | 1,762 | 18,149 | 68,627 | |
| CLL38 | Ctrl | 27,186 | 11,503 | 71,875 | 120h |
| | Cur5 | 9,711 | 9,018 | 73,387 | |
| | Veneto1 | 1,582 | 21,277 | 1,111 | |
| | Veneto+Cur | 1,243 | 29,412 | 1 | |
| CLL39 | Ctrl | 44,266 | 77,997 | 91,864 | 48h |
| | Cur5 | 30,265 | 76,302 | 93,805 | |
| | Fluda10 | 33,546 | 73,229 | 85,167 | |
| | Fluda+Cur | 17,466 | 74,16 | 91,169 | |
| CLL40 | Ctrl | 48,667 | 87,332 | 97,204 | 96h |
| | Cur5 | 37,675 | 84,834 | 96,177 | |
| | Fluda10 | 1,194 | 39,167 | 32,367 | |
| | Fluda+Cur | 0,905 | 35,861 | 25,551 | |

| | | | | | |
|-----------------------|-------------|--------|--------|--------|------|
| CLL41 | Ctrl | 44,603 | 81,727 | 94,852 | 96h |
| | Cur5 | 24,977 | 77,387 | 86,477 | |
| | Fluda10 | 2,039 | 72,035 | 47,001 | |
| | Fluda+Cur | 1,353 | 72,874 | 26,157 | |
| CLL42 (Pacient 21) | Ctrl | 44,603 | 81,727 | 94,852 | 96h |
| | Cur5 | 24,977 | 77,387 | 86,477 | |
| | Ritux10 | 49,654 | 81,71 | 56,342 | |
| | Ritux+Cur | 30,841 | 80,646 | 87,836 | |
| CLL43 | Ctrl | 35,711 | 25,736 | 96,822 | 72h |
| | Cur5 | 14,903 | 21,636 | 79,063 | |
| | Ibrutinib10 | 18,516 | 4,893 | 80,886 | |
| | Ibru+Cur | 7,089 | 1,359 | 27,273 | |
| CLL43 | Ctrl | 67,087 | 94,835 | 92,785 | 144h |
| | Cur5 | 63,071 | 94,312 | 94,349 | |
| | Fluda10 | 17,306 | 91,597 | 67,822 | |
| | Fluda+Cur | 17,711 | 91,724 | 73,777 | |
| CLL43 | Ctrl | 60,959 | 95,541 | 97,979 | 72h |
| | Cur5 | 58,74 | 96,439 | 96,498 | |
| | Fluda10 | 0,716 | 95,652 | 3,283 | |
| | Fluda+Cur | 1,248 | 93,137 | 1,404 | |
| CLL44 | Ctrl | 69,397 | 77,761 | 98,043 | 96h |
| | Cur5 | 61,818 | 73,382 | 96,04 | |
| | Fluda10 | 5,167 | 51,515 | 44,949 | |
| | Fluda+Cur | 2,385 | 55,625 | 2,697 | |
| CLL45 | Ctrl | 33,14 | 82,391 | 84,589 | 72h |
| | Cur5 | 30,985 | 80,422 | 94,741 | |
| | Fluda10 | 2,744 | 77,168 | 68,921 | |
| | Fluda+Cur | 1,926 | 77,157 | 58,26 | |
| CLL46 | Ctrl | 50,947 | 92,191 | 81,563 | 96h |
| | Cur5 | 51,022 | 92,62 | 83,4 | |
| | Fluda10 | 35,535 | 90,207 | 64,903 | |
| | Fluda+Cur | 23,555 | 92,459 | 57,9 | |
| CLL46 | Ctrl | 39,945 | 91,881 | 96,28 | 144h |
| | Cur5 | 35,178 | 93,212 | 91,618 | |
| | Fluda10 | 4,526 | 92,798 | 0,636 | |
| | Fluda+Cur | 4,417 | 94,251 | 0,452 | |
| CLL47 | Ctrl | 55,947 | 74,07 | 51,455 | 48h |
| | Cur5 | 54,908 | 83,161 | 63,089 | |
| | Fluda10 | 53,028 | 85,681 | 33,718 | |
| | Fluda+Cur | 52,081 | 86,97 | 42,761 | |
| CLL47 | Ctrl | 28,076 | 54,709 | 92,436 | 144h |
| | Cur5 | 24,895 | 77,647 | 92,296 | |
| | Fluda10 | 0,388 | 66,111 | 3,361 | |
| | Fluda+Cur | 0,224 | 62,252 | 8,511 | |
| CLL48 | Ctrl | 58,471 | 66,842 | 98,659 | 72h |
| | Cur5 | 38,418 | 63,693 | 95,568 | |
| | Fluda10 | 1,677 | 30,173 | 30,743 | |
| | Fluda+Cur | 1,167 | 29,709 | 12,887 | |
| CLL48 | Ctrl | 58,471 | 66,842 | 98,659 | 96h |
| | Cur5 | 38,418 | 63,693 | 95,568 | |
| | Fluda1 | 7,335 | 57,173 | 82,353 | |
| | Fluda1+Cur | 3,952 | 37,887 | 62,2 | |
| CLL49 | Ctrl | 51,483 | 30,29 | 98,658 | 120h |
| | Cur5 | 47,092 | 13,207 | 96,985 | |
| | Ibru10 | 22,27 | 4,587 | 58,621 | |
| | Ibru+Cur | 5,084 | 5,975 | 20,69 | |
| CLL50 (Pacient 21) | Ctrl | 51,938 | 20,011 | 97,231 | 96h |
| | Cur5 | 32,889 | 11,304 | 86,317 | |
| | Ibru10 | 33,587 | 7,725 | 64,498 | |
| | Ibru+Cur | 8,983 | 2,765 | 10,084 | |
| CLL51 (Pacient 29) | Ctrl | 27,974 | 79,988 | 93,843 | 96h |
| | Cur5 | 32,889 | 11,304 | 86,317 | |
| | Fluda10 | 2,364 | 61,327 | 20,483 | |
| | Fluda+Cur | 3,455 | 62,408 | 10,945 | |
| CLL51 (Pacient 29) | Ctrl | 27,974 | 79,988 | 93,843 | 96h |
| | Cur5 | 32,889 | 11,304 | 86,317 | |
| | Fluda1 | 9,802 | 72,752 | 83,514 | |
| | Fluda+Cur | 6,729 | 66,585 | 74,173 | |
| CLL52 | Ctrl | 43,492 | 92,383 | 21,826 | 96h |
| | Cur5 | 20,998 | 70,605 | 89,436 | |
| | Fluda10 | 2,325 | 87,308 | 13,774 | |
| | Fluda+Cur | 2,274 | 81,276 | 5,248 | |
| CLL52 | Ctrl | 43,492 | 92,383 | 21,826 | 120h |
| | Cur5 | 45,589 | 93,388 | 18,5 | |
| | Fluda1 | 13,766 | 95,696 | 30,974 | |
| | Fluda+Cur | 12,569 | 92,331 | 30,354 | |

