

# El cannabinoide sintético CP55940 induce apoptosis *in vitro* y *ex vivo* en células de Leucemia linfoblástica aguda mediada por estrés oxidativo

Viviana Soto-Mercado<sup>1</sup>, Miguel Mendivil-Pérez<sup>2</sup>  
Marlene Jiménez-Del Río<sup>3</sup>, Carlos Vélez-Pardo<sup>4</sup>  
<sup>1,2,3,4</sup> Grupo de Neurociencias de Antioquia  
Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia

**Resumen:** La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es un trastorno hematológico maligno altamente heterogéneo que se origina en los progenitores de células linfocíticas; como una alternativa terapéutica para varios tipos de cáncer, se ha propuesto un número considerable de agonistas sintéticos para los receptores de cannabinoideos, incluido el CP55940. Sin embargo, los mecanismos implicados en la muerte celular inducida por CP55940 en la LLA aún no están claros. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto citotóxico del CP55940 en linfocitos de sangre periférica (LSP), en células de LLA *in vitro* (Jurkat) y *ex vivo* (de pacientes con LLA) y dilucidar su mecanismo de acción.

Para llevar a cabo este estudio linfocitos de sangre periférica, Jurkat y células de LLA *ex vivo* (de médula ósea) fueron tratadas con CP55940 (0-50  $\mu$ M), y se evaluaron los siguientes parámetros: cambios morfológicos en el núcleo/ADN, potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y producción intracelular de especies reactivas de oxígeno reactivo (EROs), mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. También se evaluaron marcadores de apoptosis celular mediante Western blotting, inhibición farmacológica e inmuno-fluorescencia.

Los resultados obtenidos fueron: CP55940 indujo la muerte celular apoptótica en células Jurkat, pero no en LSP, de manera dosis-dependiente al aumentar la fragmentación del ADN, la detención del ciclo celular y la pérdida de  $\Delta\Psi_m$ . Además, el CP55940 incrementó la intensidad de la fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF), indicativa de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incrementó el DJ-1 Cys106-sulfonato (DJ-1 Oxidado), como un marcador de estrés intracelular, e indujo la activación de p53 y la fosforilación del factor de transcripción c-Jun. Además, aumentó la expresión de las proteínas apoptóticas BAX y PUMA, las proteínas mitocondriales PINK1 y Parkin y la caspasa-3 activa. El antioxidante N-acetil L-cisteína (NAC) y otros inhibidores farmacológicos de señalización protegieron a las células de los efectos del CP55940.

Además, el CP55940 aumentó el DJ-1 Cys106-sulfonato e indujo la activación de p53, PUMA y caspasa-3 en células de LLA *ex vivo*. Esto permite concluir que el cannabinoide sintético CP55940 induce apoptosis en células de LLA a través de una vía de señalización mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los hallazgos apoyan el uso potencial de CP55940 o sus análogos como un tratamiento potencial para LLA.

---

**Palabras Clave:** Cannabinoide, CP55940, Leucemia Linfoblástica Aguda, Estrés oxidativo, Apoptosis.

---

## INTRODUCCIÓN

En este estudio se investigó el efecto del cannabinoide sintético CP55940 como alternativa terapéutica para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA). La LLA es un trastorno hematológico proliferativo de células inmaduras tipo B (LLA-B) o tipo T (LLA-T) que conllevan a una falla en el funcionamiento normal de la médula ósea, provocando una pancitopenia secundaria por el remplazo físico de las células normales (eritrocitos, plaquetas y células inmunes de un linaje diferente al alterado) (Sabattini, Bacci, Sagramoso, & Pileri, 2010). En la actualidad la LLA presenta porcentajes altos de resistencia a los tratamientos (Pui & Evans, 2006) y es la forma más común de leucemia en personas menores de 20 años y representa más del 80% de todos los pacientes con leucemia, y el 30% de todos los cánceres. De hecho, la tasa de incidencia de la LLA es 10 veces mayor en individuos que están entre el 1 y 4 años de edad que en adultos jóvenes de 20-24 años. En Colombia, en los años 2000 las leucemias ocuparon el octavo lugar entre las muertes por cáncer con tasas de mortalidad cercanas los 4 por cada 100.000 habitantes (Piñeros-Petersen, Pardo-Ramos, Gamboa-Garay, & Hernández-Suarez, 2010).

### 1. DISERTACIÓN

En la actualidad se ha propuesto el uso de un número considerable de agonistas sintéticos para los receptores de cannabinoides como terapia anticancerígena, incluido el CP55940. Si bien existen reportes que describen los mecanismos de acción de los cannabinoides en diferentes líneas celulares, incluyendo algunos tipos de cáncer, los mecanismos implicados en la muerte celular inducida de manera específica por el CP55940 en células usadas como modelos de la LLA o en poblaciones celulares provenientes de pacientes con leucemia aún no se han determinado completamente (Deng, Cornett, Mackie, & Hohmann, 2015; Santana et al., 2016).

En este sentido, este trabajo se enfocó en estudiar el potencial efecto anti-leucémico del cannabinoide sintético CP55940 en un modelo celular de LLA, conocido como células Jurkat. De igual forma, el efecto fue evaluado de manera simultánea en un cultivo primario de linfocitos humanos (LSP) con el fin de determinar si la actividad citotóxica del cannabinoide ocurre de manera específica sobre células leucémicas. Finalmente, el efecto de esta molécula fue determinado en células provenientes de la médula ósea de pacientes con LLA.

De acuerdo con lo anterior, LSP, Jurkat y las células de LLA provenientes de pacientes fueron tratadas con CP55940 (0-50  $\mu$ M), luego de lo cual, se evaluaron los siguientes parámetros:

- a) Cambios morfológicos en el núcleo celular/ADN determinados mediante tinciones fluorescentes del ADN (Hoechst y yoduro de propidio) y cuantificados por las técnicas de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.
- b) Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) analizado mediante el uso de una sonda fluorescente (DiOC6(3)) de carga catiónica.
- c) Producción intracelular de Especies Reactivas de Oxígeno reactivo (EROS) mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo mediante la tinción con diclorofluoresceína (DCF).

- d) También se evaluaron marcadores de apoptosis celular y daño mitocondrial (DJ-1 oxidada, p53, c-Jun, caspasa-3, BAX, PUMA, PINK1, Parkin) mediante Western blotting, inhibición farmacológica e inmuno-fluorescencia.

### 1.1. DESARROLLO

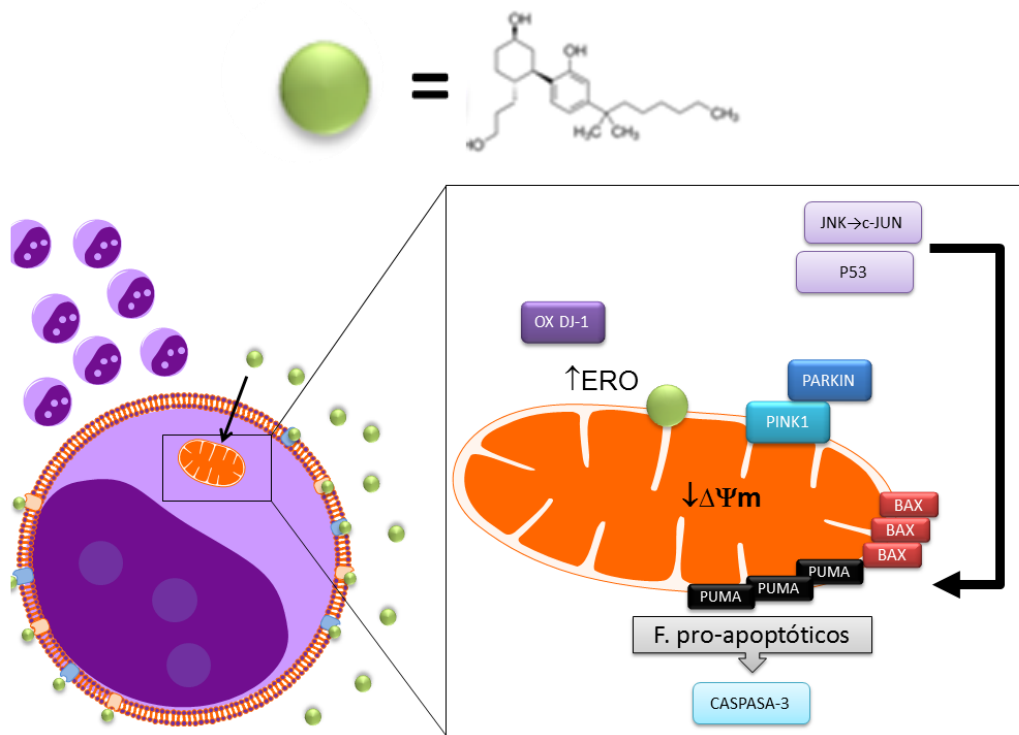
La ejecución experimental muestra que la aplicación del cannabinoide CP55940 a un cultivo de células Jurkat induce la aparición de marcadores morfológicos y moleculares de apoptosis incluyendo la disipación del  $\Delta\Psi_m$  y la fragmentación y/o pérdida del contenido de ADN así como la detención del ciclo celular. Este efecto no ocurrió en cultivos de linfocitos humano. Además, el CP55940 incrementó los niveles de los marcadores de estrés oxidativo, incluyendo el aumento de la fluorescencia de la DCF e incrementó los valores de la proteína DJ-1 Cys106-sulfonato (DJ-1 Oxidada). Este cannabinoide también indujo la activación de factores pro-apoptóticos como p53 y la fosforilación del factor de transcripción c-Jun. Además, aumentó la expresión de las proteínas apoptóticas BAX y PUMA, las proteínas asociadas a daño mitocondrial PINK1 y Parkin y la ejecutora de muerte celular, caspasa-3 activada. El antioxidante N-acetil L-cisteína (NAC) y otros inhibidores farmacológicos de señalización protegieron a las células de los efectos del CP55940. Además, el CP55940 aumentó el DJ-1 Cys106-sulfonato e indujo la expresión de p53, PUMA y caspasa-3 en células de LLA *ex vivo*.

### 1.2. ASPECTOS CENTRALES

Estas observaciones permitieron concluir que el cannabinoide sintético CP55940 induce apoptosis selectivamente en células de LLA a través de una vía de señalización mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> así:

CP55940 → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → oxidación de DJ-1 → p53 → c-Jun → PUMA/ BAX → pérdida del potencial de membrana mitocondrial → localización mitocondrial de PINK1 y Parkin → activación de caspasa-3 → fragmentación del ADN → arresto del ciclo celular → apoptosis

Figura 1: mecanismo de acción del cp55940 en CÉLULAS DE LLA



Fuente: (Soto-Mercado, Mendivil-Pérez, Jiménez-Del Río, Vélez- Pardo, 2017)

## CONCLUSIONES

Los hallazgos apoyan el uso potencial de CP55940 o sus análogos como un potencial medicamento en ensayos clínicos enfocados en la búsqueda de alternativas terapéuticas para la LLA.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por la “Fundación Alfonso Moreno Jaramillo”. Proyecto # 2018-20454 y por el Fondo nacional de financiamiento para la ciencia, la tecnología y la innovación “Francisco José de Caldas” (Convocatoria posdoctoral 784-2017; MM-P)

## REFERENCIAS

Deng, L., Cornett, B. L., Mackie, K., & Hohmann, A. G. (2015). CB1 Knockout Mice Unveil Sustained CB2-Mediated Antiallodynic Effects of the Mixed CB1/CB2 Agonist CP55,940 in a Mouse Model of Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain. *Mol Pharmacol*, 88(1), 64-74.

Piñeros-Petersen, M., Pardo-Ramos, C., Gamboa-Garay, O., & Hernandez-Suarez, G. (2010). Atlas de mortalidad por cancer en Colombia (3 ed.). Available from: <http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=-1&conID=758&pagID=1307>: Instituto Nacional de Cancerología E.S.E; Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).

Pui, C. H., & Evans, W. E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 354(2), 166-178.

Sabattini, E., Bacci, F., Sagramoso, C., & Pileri, S. A. (2010). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*, 102(3), 83-87.

Santana, F., Sierra, R. O., Haubrich, J., Crestani, A. P., Duran, J. M., de Freitas Cassini, L., et al. (2016). Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: Effects of CP55,940. *Neurobiol Learn Mem*, 127, 42-47.