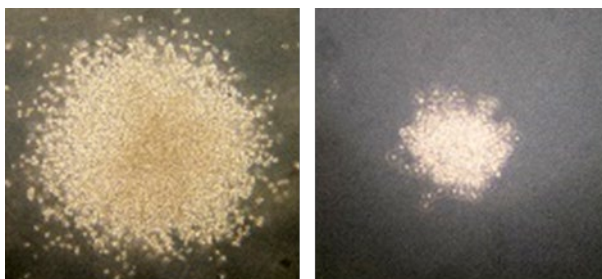


Derivados sintéticos de la 1,3-difenilpropenona como potenciales agentes antileucémicos



Henoc del Rosario García

Las Palmas de Gran Canaria

Noviembre de 2022

Programa de Doctorado:

Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESCUELA DE DOCTORADO DE LA ULPGC

Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias

PROGRAMA DE DOCTORADO

Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, la Universidad de León y la Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Título de la Tesis:

Derivados sintéticos de la 1,3-difenilpropenona como potenciales agentes antileucémicos

presentada por D. Henoc del Rosario García que opta a la Tesis con mención internacional

Dirigida por el Dr. Francisco Jesús Estévez Rosas y el Dr. José Martín Quintana Aguiar

El Doctorando

El Director

El Director



Las Palmas de Gran Canaria, a 24 de noviembre de 2022



D. FRANCISCO JESÚS ESTÉVEZ ROSAS Y D. JOSÉ MARTÍN QUINTANA
AGUIAR, CATEDRÁTICOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD
DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado "Derivados sintéticos de la 1,3-difenilpropenona como potenciales agentes antileucémicos", ha sido realizado por D. Henoc del Rosario García, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo su dirección y asesoramiento científico y técnico, y que una vez revisada la presente memoria, la encuentran apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extienden la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria a 15 de noviembre de 2022

El Director

El Director

Esta tesis ha sido posible gracias al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y gracias al Consejo Social de la ULPGC.

ABREVIATURAS

- ABCG2: casete de unión a ATP G2
- Ara-C: 1-β-D-arabinofuranosilcitosina
- Bak: proteína antagonista/asesina de Bcl-2
- Bax: proteína X asociada a Bcl-2
- Bcl-2: proteína 2 de linfoma de células B
- Bid: proteína agonista del dominio de muerte que interactúa con BH3.
- Bim: proteína 11 similar a Bcl-2
- BSA: albúmina de suero bovino
- Bcl-x_L: proteína extragrande de linfoma de células B
- CAT: catalase
- CCCP: carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
- CH₂Cl₂: diclorometano
- CHAPS: 3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propanesulfonato
- ΔΨ_m: potencial de la membrana mitocondrial
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCF: diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
- DEVD-pNA: N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DR4: receptor de muerte 4
- DR5: receptor de muerte 5
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EGTA: ácido tetraacético de etilenglicol
- EIMS: espectroscopía de masas de ionización electrónica
- ERK1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2
- EtOH: etanol
- FDA: administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
- FMC: 2-[3-(4-metoxifenil)acriloil]fenil furan-2-carboxilato

- FOS: síntesis orientada a la función
- GTP: guanosín trifosfato
- H₂O₂: agua oxigenada
- HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etano-1-sulfónico
- HREIMS: Espectrometría de masas de ionización electrónica de alta resolución
- IC₅₀: concentración que inhibe al 50% la viabilidad celular
- IETD-pNA: N-Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilina
- JC-1: yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina
- JNK/SAPK: *c-jun* *N*-terminal quinasas/proteínas quinasas activadas por estrés
- KDa: kilo daltons
- LEHD-pNA: N-Ac-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroanilina
- MAPK: proteínas quinasa activadas por mitógenos
- Mcl-1: proteína 1 de leucemia mieloide
- MEK: quinasas extracelulares activadas por mitógenos
- MHz: megahercios
- MTT: [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio de bromuro]
- PARP: poli(ADP-ribosa) polimerasa
- PBMC: células mononucleares de sangre periférica
- PBS: tampón fosfato salino
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- ppm: partes por millón
- PS: Ponceau S
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- RMN: espectroscopía de resonancia magnética nuclear
- SAR: relación estructura actividad
- SEM: error estándar de la media

- TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
- z-VAD-fmk: inhibidor general de las caspasas

ÍNDICE

ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	9
-Metodología para la síntesis química	9
-Datos espectroscópicos de los compuestos 1-14	10
-Cultivos celulares	16
-Ensayos de citotoxicidad	17
-Ensayo de formación de colonias en agar	18
-Evaluación y cuantificación de apoptosis por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo	18
-Ensayo de polimerización de la tubulina	18
-Immunocitoquímica	19
-Ensayo de la actividad caspasa	20
-Experimentos de <i>Western blot</i> y fraccionamiento	20
-Análisis del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ y determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares	21
-Métodos estadísticos	21
-Reactivos	22
RESULTADOS	25
-Síntesis Química	25
-La evaluación de flavonoides sintéticos revela que la 2'- furoiloxi-4-metoxicalcona inhibe la viabilidad de las células tumorales humanas	26
-La furoiloxichalcona indujo la parada del ciclo celular en G ₂ -M y la apoptosis en células de leucemia mieloide humana	34

-Activación de caspasas y escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa inducidas por la furoiloxichalcona	40
-La furoiloxichalcona indujo la liberación de citocromo <i>c</i> pero no disminuyó el potencial de membrana mitocondrial	43
-La expresión de niveles elevados de Bcl-2 confiere protección contra la apoptosis inducida por la furoiloxichalcona	45
-La furoiloxichalcona regula negativamente a Bcl-xL y Mcl-1 y aumenta los niveles de DR5	47
-La furoiloxichalcona aumentó la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular fue bloqueada por la catalasa y se asoció con la activación de la vía MAPK	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	57
CONCLUSIONS	59
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	67

ABSTRACT

Synthetic flavonoids with new substitution patterns have attracted attention as potential anticancer drugs. Here, twelve chalcones were synthesized and their antiproliferative activities against five human tumour cells were evaluated. This series of chalcone derivatives was characterized by the presence of an additional aromatic or heterocyclic ring linked by an ether, in the case of a benzyl radical, or an ester or amide functional group in the case of a furoyl radical. In addition, the influence on cytotoxicity by the presence of one or three methoxy groups or a 2,4-dimethoxy-3-methyl system on the B ring of the chalcone scaffold was also explored. The results revealed that the most cytotoxic chalcones contain a furoyl substituent linked by an ester or an amide through the 2'-hydroxy or the 2'-amino group of the A ring of the chalcone skeleton, with IC_{50} values between $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $1.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ against human leukaemia cells. The synthetic chalcone 2'-furoyloxy-4-methoxychalcone (FMC) was, at least, ten-fold more potent than the antineoplastic agent etoposide against U-937 cells and displayed less cytotoxicity against human peripheral blood mononuclear cells. Treatment of U-937 and HL-60 cells with FMC induced cell cycle arrest at the G₂-M phase, an increase in the percentage of sub-G₁ and annexin-V positive cells, the release of mitochondrial cytochrome *c*, activation of caspase and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. In addition, it inhibited tubulin polymerization *in vitro* in a concentration dependent manner. Cell death triggered by this chalcone was decreased by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk and was dependent of the generation of reactive oxygen species. We conclude that this furoyloxychalcone may be useful in the development of a potential anti-leukaemia strategy.

La leucemia se encuentra entre los cánceres más diagnosticados en adolescentes y sigue siendo el cáncer que más muertes provoca en el grupo de edad de los 15 a los 29 años [1]. De acuerdo con las estadísticas de incidencia y mortalidad a nivel mundial de la base de datos GLOBOCAN para 2020, las cifras estimadas de nuevos casos y muertes por leucemia fueron de 474 519 y 311 594 respectivamente, lo que deja ver que la ratio de mortalidad de este grupo heterogéneo de enfermedades es aún muy alta [2], requiriéndose terapias nuevas para incrementar la eficacia.

La leucemia mieloide aguda es una de las leucemias más comunes diagnosticadas en adultos. La supervivencia relativa a 5 años para niños y adolescentes es del 67 %, pero desciende al 7 % para pacientes de 65 años o más [3]. La inmunoterapia y los fármacos moleculares dirigidos han mejorado la supervivencia a las neoplasias malignas hematopoyéticas y linfoides, pero la resistencia a las terapias convencionales es una de las principales limitaciones del tratamiento. La evasión de la apoptosis se considera uno de los mecanismos de resistencia a los tratamientos convencionales contra el cáncer.

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada, que da como resultado la eliminación selectiva de células con una respuesta inflamatoria mínima [4]. Esta muerte celular está catalizada por la actividad proteolítica de las caspasas, una familia de cisteín-aspartato proteasas que se expresan en las células como zimógenos conocidos como procaspasas. Estas enzimas escinden predominantemente a sus sustratos por el lado C-terminal de un residuo de aspartato [5]. La escisión proteolítica conduce a importantes cambios bioquímicos y morfológicos, como la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular, la formación de evaginaciones en la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de vesículas apoptóticas.

INTRODUCCIÓN

Se han descrito dos vías apoptóticas principales, la intrínseca y la extrínseca [6]. La vía intrínseca o mitocondrial se inicia por perturbaciones del microambiente intracelular o extracelular, está caracterizada por un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, la liberación citosólica de factores apoptogénicos y la activación de la caspasa-3. La vía extrínseca se inicia en la membrana celular con los receptores de muerte y se caracteriza por la activación de la caspasa-8 y la maduración proteolítica de las caspasas ejecutoras, principalmente la caspasa-3 [7].

Los productos naturales representan opciones realistas como posibles agentes anticancerígenos. Así, desde 1981 hasta la actualidad, y en el área de la oncología, la utilización de los mismos para describir y desarrollar el producto farmacológico final ha representado un 33,5 % del total de las moléculas pequeñas empleadas para tal fin. El porcentaje puede incrementarse si también se incluyeran aquellos compuestos inspirados en productos naturales [8, 9].

Los flavonoides son metabolitos polifenólicos vegetales que exhiben actividades farmacológicas notables [10, 11]. Estos compuestos son capaces de interferir en todas las fases de la progresión del cáncer mediante la modulación de proteínas clave implicadas en la angiogénesis, la apoptosis, la diferenciación, la metástasis, la proliferación y la resistencia a múltiples agentes antineoplásicos [12].

En particular, la versión acíclica de los flavonoides, las chalconas, que son pequeñas moléculas muy simples, tienen una estructura privilegiada y exhiben citotoxicidad relevante contra varias células cancerosas y una baja citotoxicidad contra las células normales humanas [13,14].

Además, muchos productos naturales contienen furano, que es un componente importante en el desarrollo de nuevas terapias [15] y que aparece en 10 medicamentos aprobados por la FDA [16].

El objetivo de este estudio fue (i) sintetizar una serie de derivados lineales de chalcona junto con dos compuestos cíclicos que contienen grupos donantes de electrones (MeO- y Me-) en el anillo B y (ii) explorar el efecto de la presencia de un sustituyente furoilo en el anillo A del esqueleto de la chalcona sobre la citotoxicidad en varias células tumorales humanas.

Dado que los productos naturales biológicamente activos a veces plantean algunas dificultades para su uso terapéutico, tales como que sean escasos o difíciles de aislar o que presenten una complejidad excesiva, la base para el diseño de estos compuestos es la aplicación del concepto de síntesis orientada a la función (FOS), una estrategia dirigida a la síntesis de compuestos simples con mejor actividad. Dicha estrategia se basa en el principio que sostiene que la función de un compuesto biológicamente activo puede ser resumida, ajustada o mejorada con estructuras más simples para facilitar la síntesis y la innovación en el proceso de síntesis [17].

Así, hemos explorado la influencia de diferentes sustituyentes en ambos anillos del esqueleto de la chalcona. Estos incluían (i) la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo A o un radical bencilo, (ii) un anillo de furano unido por un enlace éster o amida y (iii) la presencia de un 4-metoxi o 3,4,5-trimetoxi o sistemas 2,4-dimetoxi-3-metilo en el anillo B. Además, exploramos las vías de transducción de señales de muerte celular desencadenadas por la 2'-furoiloxi-4-metoxichalcona, uno de los compuestos más citotóxicos para las células de leucemia humana U-937 y HL-60. Estas líneas celulares se seleccionaron porque se utilizan con frecuencia en la investigación biomédica para el estudio de terapias y la neoplasia, y han sido esenciales en la consecución de importantes contribuciones a las disciplinas de la inmunología, hematología y cáncer [18,19].

OBJETIVOS

Sintetizar una serie de compuestos químicos inspirados en flavonoides con diferentes patrones de sustitución.

Realizar ensayos de citotoxicidad utilizando diferentes líneas establecidas de células cancerígenas humanas.

En base a los resultados anteriores, seleccionar el compuesto más activo para dilucidar el mecanismo de acción por el cual lleva a cabo su actividad citotóxica.

Metodología para la síntesis química

Los procedimientos de síntesis química se realizaron por parte de investigadores del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPNA-CSIC) de La Laguna (Tenerife, España), bajo la supervisión del Dr. Ignacio Brouard Martín, y del Departamento de Química Orgánica del Instituto Universitario de Bio-orgánica Antonio González de la Universidad de La Laguna (Tenerife, España), bajo la supervisión de la Dra. Celina García González. Además, los datos espectroscópicos de los compuestos fueron proporcionados por dichos investigadores.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Ascen 400 con secuencias de pulso estándar funcionando a 400 MHz en ^1H y 101 MHz en ^{13}C . Los valores de desplazamiento químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm). Los espectros de masas, tanto de baja como de alta resolución, se realizaron mediante la técnica de impacto electrónico (EIMS y HREIMS), y se registraron en el espectrómetro Micromass Autospec (70 eV). La cromatografía en columna se llevó a cabo en gel de sílice de 60 (malla Merck 230-400), y la cromatografía en capa fina analítica se realizó utilizando láminas de aluminio de gel de sílice.

A continuación, se describe el procedimiento general para la síntesis de las chalconas (**1**, **3**, **5**, **7**, **9**, **11**). Una mezcla de acetofenona (5-10 mmol, 1 equiv) y el correspondiente benzaldehído (1 equiv) en EtOH (20-40 ml) se agitó a temperatura ambiente y se añadió una disolución acuosa al 50% de NaOH (5-8 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumieron los reactivos de partida. Luego se añadió HCl (10 %) hasta alcanzar la neutralidad. Las chalconas precipitadas generalmente se filtraron y cristalizaron en MeOH, aunque en algunos casos el producto se purificó mediante cromatografía en columna.

MATERIAL Y MÉTODOS

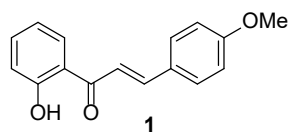
En cuanto al procedimiento general para la síntesis de los derivados furoílo (**2**, **4**, **6**, **8**, **10**, **12**, **14**), se añadió cloruro de furoílo (1:1 equiv.), a temperatura ambiente bajo argón, a una disolución de 2'-hidroxicalcona (aprox. 0.05 mmol, 1.0 equiv) y trietilamina (1.5 equiv) en CH₂Cl₂ seco (0.1 M). Después de agitarse durante 6 h, la mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado, se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron. El filtrado se concentró al vacío y luego el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (eluida con Hexano:Acetato de Etilo 3:1) sobre gel de sílica para producir los derivados de furoílo (**2**, **4**, **6**, **8**, **10**, **12** y **14**).

Por último, en el procedimiento para la síntesis del flavonol (**13**), una solución de 2-hidroxicalcona **1** (0.1-0.2 mmol) en KOH 3.0 M en MeOH (2-3 mL) se enfrió a 0 °C. Se añadió una solución acuosa de H₂O₂ (30 %) (0.5 mL) a la solución de chalcona. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente, hasta que el material de partida se consumió totalmente (como se evidenció por TLC). La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió agua destilada (2-4 mL) junto con HCl (2 M) hasta llegar a un pH 2. El precipitado se filtró y se lavó con agua destilada y se recristalizó en MeOH.

Datos espectroscópicos de los compuestos 1-14

(*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**1**): Sólido amorfo naranja (82%).

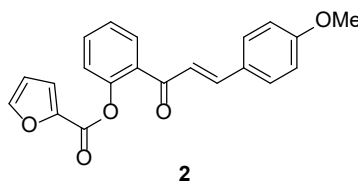
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.48-7.38 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 2H), 7.30 (dd, *J* = 3.5, 0.9 Hz, 1H), 7.29-7.22 (m, 3H), 7.17 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.15-7.09 (m, 1H), 7.06 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 192.2, 156.9, 156.3,



MATERIAL Y MÉTODOS

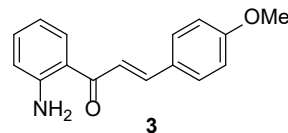
148.1, 147.3, 143.5, 139.5, 139.4, 136.2, 131.4, 131.0, 129.2, 128.5, 128.4, 127.9, 127.0, 126.2, 124.8, 123.3, 119.8, 118.7, 115.6, 112.1, 110.5, 70.7. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 277.0846 [M+Na]; calculado para $C_{16}H_{14}NaO_3$: 277.0837.

(*E*)-2-[3-(4-metoxifenil)acriloil]fenil furan-2-carboxilato (**2**): Aceite amarillo (60%). 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.62-7.51 (m, 3H), 7.48-7.41 (m, 2H), 7.39 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.34-7.28 (m, 2H), 7.07 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.90-



6.81 (m, 2H), 6.49 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 191.4, 161.7, 156.5, 148.0, 147.2, 145.4, 143.6, 132.8, 132.2, 130.2, 129.9, 127.2, 126.2, 123.3, 123.3, 119.9, 114.3, 112.2, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 371.0897 [M+Na]; calculado para $C_{21}H_{16}NaO_5$: 371.0895.

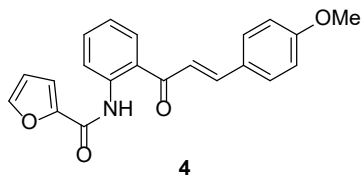
(*E*)-1-(2-aminofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**3**): Sólido amorfo naranja (75%). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.86 (dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 15.5$



Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.33-7.23 (m, 1H), 6.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.74-6.65 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 191.8, 161.3, 150.8, 142.8, 134.1, 130.9, 129.9, 128.0, 120.8, 119.3, 117.2, 115.8, 114.3, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 276.0998 [M+Na]; calcd. for $C_{16}H_{15}NNaO_2$: 276.1000.

(E)-N-{2-[3-(4-metoxifenil) acriloil] fenil}furan-2-carboxamida (**4**):

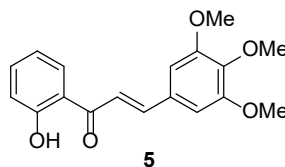
Sólido amorfo amarillo (68%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 12.57 (s, 1H), 8.87 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H),



8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.69-7.55 (m, 4H), 7.49 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 3.5, 0.9 Hz, 1H), 7.20 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.2 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.56 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 193.3, 162.0, 156.9, 148.3, 145.6, 144.9, 140.7, 134.5, 130.5, 130.4, 127.4, 123.9, 122.6, 121.2, 120.3, 115.3, 114.5, 112.2, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 385.0681 [M+Na]; calculado para C₂₁H₁₄NaO₆: 385.0688.

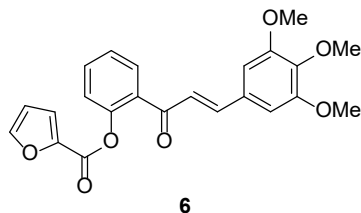
(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (**5**):

Sólido amorfo naranja (77%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 12.84 (s, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 15.4



Hz, 1H), 7.57-7.48 (m, 2H), 7.04 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.96 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 6.89 (s, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.92 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 193.5, 163.6, 153.5, 145.6, 140.8, 136.3, 130.0, 129.6, 120.0, 119.3, 118.8, 118.6, 105.9, 61.0, 56.3. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 337.1046 [M+Na]; calculado para C₁₈H₁₈NaO₅: 337.1052.

(E)-2-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)acriloil]fenil furan-2-carboxilato (**6**): Aceite amarillo (55%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.55-7.49 (m, 2H), 7.41 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.34 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H),

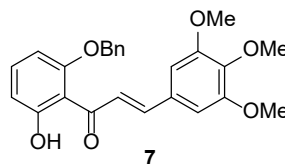


MATERIAL Y MÉTODOS

7.29-7.22 (m, 2H), 6.99 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 6.43 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 191.5, 161.8, 156.5, 153.4, 148.0, 147.3, 145.6, 143.6, 140.4, 132.6, 132.4, 129.9, 126.3, 125.0, 123.4, 120.0, 112.2, 105.6, 61.0, 56.1. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 431.1093 [$\text{M}+\text{Na}$]; calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{NaO}_7$: 431.1107.

(E)-1-[2-(benziloxi)-6-hidroxifenil]-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (7):

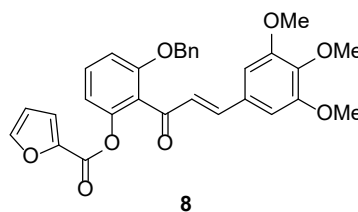
Sólido amorfo amarillo (75%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 13.09 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H),



7.47-7.32 (m, 3H), 7.32-7.17 (m, 4H), 6.66 (dd, $J = 8.4, 1.0$ Hz, 1H), 6.62 (s, 2H), 6.54 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.67 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 194.3, 164.8, 160.0, 153.2, 143.1, 140.2, 135.9, 135.8, 130.5, 128.7, 128.2, 127.2, 127.0, 112.4, 111.3, 105.8, 102.7, 71.1, 60.9, 56.0. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 443.1479 [$\text{M}+\text{Na}$]; calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NaO}_6$: 443.1471.

(E)-3-(benziloxi)-2-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)acriloil]fenil furan-2-carboxilato (8):

Aceite amarillo pálido (48%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.32 (dt, $J = 6.0, 2.1$ Hz, 3H), 7.29-7.27 (m,



2H), 7.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H), 6.95 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.52 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 192.3, 156.8, 156.4, 153.3, 147.9, 147.4, 146.2, 143.4, 140.3, 136.2, 130.8, 130.0, 128.5, 127.9, 127.3, 127.0, 123.4, 119.9, 115.5, 112.1, 110.5,

MATERIAL Y MÉTODOS

105.6, 70.6, 60.9, 56.1. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 537.1528 [M+Na]; calculado para $C_{30}H_{26}NaO_8$: 537.1525.

(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3,4,5-

trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (**9**): Sólido

amorfo naranja (78%). 1H RMN (500 MHz,

$CDCl_3$) δ 7.86 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1H), 7.65

(d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H),

7.30 (ddd, $J = 8.4, 7.0, 1.5$ Hz, 1H), 6.85 (s,

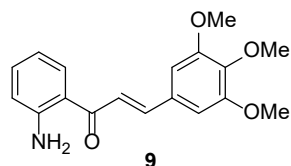
2H), 6.77-6.66 (m, 2H), 6.32 (s, 2H), 3.92 (s, 6H), 3.90 (s, 3H). ^{13}C

NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 191.5, 153.4, 150.9, 143.1, 140.1, 134.2,

130.9, 130.8, 122.4, 119.1, 117.3, 115.8, 105.5, 61.0, 56.2. HRMS

(ESI-FT-ICR) m/z : 314.1394 [M+H]; calculado para for $C_{18}H_{20}NO_4$:

314.1392.



(E)-N-{2-[3-(3,4,5-trimetoxifenil)

acriloil] fenil}furan-2-carboxamida

(**10**): Aceite amarillo pálido (57%). 1H

RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 12.51 (s,

1H), 8.88 (dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, 1H),

8.03 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.86-

7.74 (m, 1H), 7.69-7.57 (m, 2H), 7.48 (dt, $J = 15.4, 1.4$ Hz, 1H), 7.28

(d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.25-7.19 (m, 1H), 6.88 (t, $J = 1.4$ Hz, 2H), 6.57

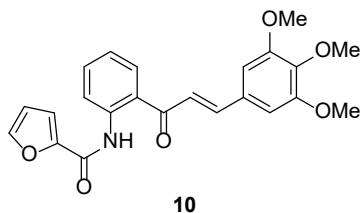
(dd, $J = 3.4, 1.7$ Hz, 1H), 3.93 (s, 7H), 3.92 (s, 3H). ^{13}C NMR (126

MHz, $CDCl_3$) δ 193.3, 156.9, 153.5, 148.3, 145.9, 145.0, 140.8, 140.7,

134.7, 130.6, 130.1, 123.7, 122.6, 122.0, 121.3, 115.4, 112.3, 105.8,

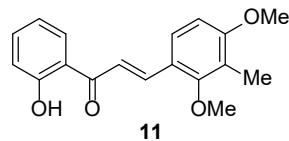
61.0, 56.2. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 430.1362 [M+Na]; calculado

para $C_{23}H_{21}NNaO_6$: 430.1267.



(E)-3-(2,4-dimetoxi-3-metilfenil)-1-(2-

hidroxifenil) prop-2-en-1-ona (**11**): Sólido amorfo amarillo (84%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 13.01 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.71 (d,

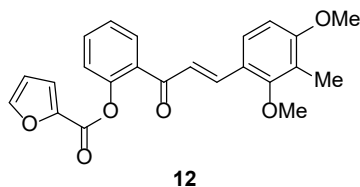


J = 15.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.48 (ddd, *J* = 8.6, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.93 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 2.19 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 194.1, 163.5, 161.3, 159.6, 141.4, 136.0, 129.5, 127.4, 120.8, 120.6, 120.2, 118.7 (x2), 118.5, 106.6, 61.5, 55.8, 8.94. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 430.1362 [M+Na]; calculado para C₂₃H₂₁NNaO₆: 430.1267.

(E)-2-[3-(2,4-dimetoxi-3-metilfenil)

acriloil]fenil furan-2-carboxilato (**12**):

Aceite amarillo pálido (42%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.61-7.53 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 2H),

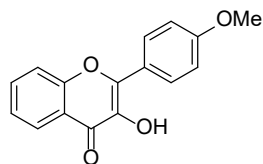


7.35-7.29 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.13 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 191.8, 161.0, 159.3, 156.5, 148.0, 147.2, 143.7, 141.4, 132.9, 132.1, 129.9, 126.5, 126.1, 124.2, 123.3, 120.7, 120.3, 119.8, 112.1, 106.5, 61.5, 55.7, 8.8. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 415.1154 [M+Na]; calculado para C₂₃H₂₀NaO₆: 415.1158.

(E)-3-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (**13**):

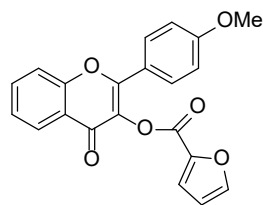
Sólido amorfo amarillo pálido (79%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.25 (d, $J = 9.0$ Hz, 3H), 7.70 (ddd, $J = 8.6, 7.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 8.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.41 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.16, 161.12, 155.31, 145.34, 137.65, 133.38, 129.55, 125.42, 124.45, 123.56, 120.74, 118.20, 114.12, 55.44. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 291.0633 [M+Na]; calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{NaO}_4$: 291.0633.



13

(E)-2-(4-metoxifenil)-4-oxo-4H-cromen-3-yl furan-2-carboxylate (**14**):

White amorphous solid (60%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.27 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.76-7.65 (m, 2H), 7.57 (dd, $J = 8.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.47-7.40 (m, 2H), 6.99 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.60 (dd, $J = 3.6, 1.7$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 162.0, 156.4, 155.5, 155.4, 147.4, 143.4, 133.8, 132.5, 130.1, 126.2, 125.1, 123.6, 122.1, 120.3, 118.0, 114.2, 112.3, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 385.0681 [M+Na]; calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{NaO}_6$: 385.0688.



14

Cultivos celulares

Las células de leucemia humana U-937 (pro-monocítica, leucemia mieloide, ACC-5), HL-60 (leucemia mieloide aguda, ACC-3), MOLT-3 (leucemia linfoblástica aguda, ACC-84), Jurkat (leucemia linfoblástica aguda, ACC-282) y NALM-6 (leucemia precursora de células B humana, ACC-128) y las células de melanoma humano SK-MEL-1 (ACC-303) y MEL-HO (ACC-62) se obtuvieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares

MATERIAL Y MÉTODOS

(Braunschweig, Alemania). Las células U-937/Bcl-2 fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Jacqueline Bréard (INSERM U749, Faculté de Pharmacie Paris-Sud, Châtenay-Malabry, Francia).

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % (v/v), estreptomycin 100 µg/mL y penicilina 100 U/mL, se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda que contenía un 5 % de CO₂ como se describe [20]. Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) anticoagulada con heparina se aislaron de donantes sanos mediante centrifugación con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las PBMC también se estimularon con fitohemaglutinina (2 µg/ml) durante 48 h antes del tratamiento experimental. La viabilidad siempre fue superior al 95% en todos los experimentos, según lo determinado por el método de exclusión con azul de tripán.

Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los compuestos sintéticos se evaluó mediante ensayos colorimétricos con MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio de bromuro] como se describe [21]. Los compuestos se disolvieron en DMSO (dimetilsulfóxido) y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 25 °C. Antes de cada experimento, los compuestos se disolvieron en medio de cultivo a 37 °C. La concentración final de DMSO no superó el 0.3 % (v/v). Las células (5000 por pocillo) se incubaron con concentraciones crecientes de los compuestos durante 72 h en una placa de 96 pocillos. Luego, se eliminó el sobrenadante, se agregó MTT (0.5 mg/mL), se incubó a 37 °C durante 4 h y los productos de reacción se solubilizaron con dodecilsulfato de sodio (10 % p/v) en HCl 0.05 M durante la noche en condiciones de oscuridad. La absorbancia se midió a 570 nm usando un lector ELISA (Bio-Rad) y los valores IC₅₀ se determinaron gráficamente para cada experimento mediante una regresión no lineal

usando el método de ajuste de curvas implementado dentro del software Prism 5.0 (GraphPad).

Ensayo de formación de colonias en agar

Las células (1000) se cultivaron en una capa de agar (0.3 % p/v) mezclado con medio de cultivo celular RPMI 1640 que descansaba sobre otra capa de agar (0.5 % p/v), también mezclado con medio RPMI 1640 en placas de 6 pocillos y se incubaron con las concentraciones indicadas de FMC o etopósido durante doce días. Luego, las células se tiñeron agregando 200 μ L de disolución de cloruro de nitroazul de tetrazolio (1 mg/mL en PBS) por pocillo y las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

Evaluación y cuantificación de apoptosis por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo

El análisis de microscopía de fluorescencia se llevó a cabo como se describió previamente. Brevemente, después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se fijaron en paraformaldehído al 3 %, se tiñeron con 20 μ g/mL de trihidrocloruro de bisbenzimidaz (Hoechst 33258) y se visualizaron con microscopía de fluorescencia (Zeiss-Axiovert). El análisis de citometría de flujo de núcleos teñidos con yoduro de propidio y de las células doblemente marcadas con anexina V-FITC y yoduro de propidio se realizó utilizando un citómetro BD FACSVerserTM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) como se describió anteriormente [21].

Ensayo de polimerización de la tubulina

Los ensayos de polimerización de tubulina *in vitro* se realizaron con los reactivos descritos por el fabricante (Cytoskeleton Inc., Denver, CO,

MATERIAL Y MÉTODOS

USA). Brevemente, se incubaron concentraciones crecientes de FMC con tubulina de cerebro bovino purificada en un tampón que contenía GTP 1 mM y glicerol al 10 % a 37 °C, y se midió el aumento de absorbancia a 340 nm en un lector de microplacas Beckman Coulter DTX880 a 37 °C, registrándose la misma cada 30 s durante 50 min.

Immunocitoquímica

Las células se trataron con FMC 3 μ M durante 12 h y se procesaron para inmunofluorescencia usando un anticuerpo monoclonal contra α -tubulina. Brevemente, después de los tratamientos, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 500 \times g durante 10 min, se lavaron con PBS y se adhirieron mediante citocentrifugación en portaobjetos de microscopio. Las células adherentes se fijaron durante 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 3 %, se lavaron una vez con PBS durante 5 min, luego con glicina 0.1 M durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de PBS, permeabilizadas (0.25 % Triton X-100), lavadas con PBS y se bloqueó con BSA al 5 % y suero de cabra normal al 5 % en PBS que contenía Triton X-100 al 0.025 % durante 1 hora. Después de lavar dos veces con PBS, las células se incubaron con BSA al 1 % en PBS que contenía Triton X-100 al 0.025 % con el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (#2125, Cell Signaling Technology, dilución 1:100) durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS, las células se incubaron en oscuridad con anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen, dilución 1:1000) durante 90 minutos. Luego, las células se lavaron de nuevo con PBS y se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1,5 μ g/mL). Las imágenes de microtúbulos celulares se obtuvieron utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse 80i con un objetivo de 40x.

Ensayo de la actividad caspasa

La actividad caspasa se determinó en lisados celulares usando sustratos colorimétricos específicos. Brevemente, las células se trataron con 3 μM de FMC durante diferentes períodos de tiempo (6-24 h), se recolectaron por centrifugación (1000x g durante 5 min a 4 °C), se lavaron con PBS, se lisaron con un tampón (HEPES 50 mM, pH 7.4, ditiotreitól 1 mM, EDTA 0.1 mM, Chaps al 0.1 %), se centrifugaron (17 000x g durante 10 min a 4 °C) y los sobrenadantes normalizados por concentración de proteínas se usaron para determinar la actividad de la caspasa. El aumento neto de la absorbancia a 405 nm después de la incubación a 37 °C fue indicativo de la actividad enzimática. Los sustratos colorimétricos fueron DEVD-*pNA* (*N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina), IETD-*pNA* (*N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina) y LEHD-*pNA* (*N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina) para las actividades de caspasa-3/7, -8 y -9, respectivamente.

Experimentos de *Western blot* y fraccionamiento subcelular

Los lisados totales y las fracciones citosólicas se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se describió anteriormente. Para los lisados totales, los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de lisis [Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), NaCl 137 mM, β -glicerofosfato de sodio 20 mM, fluoruro de sodio 10 mM, pirofosfato de tetrasodio 2 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 1 % más los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM), aprotinina, leupeptina y pepstatina A (1 mg/mL cada uno)], se homogeneizó por sonificador (cinco ciclos) y se centrifugó a 11 000x g durante 10 min a 4 °C.

Se cargaron cantidades iguales de proteínas de los sobrenadantes en un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (10 % para MAPK y 12,5 % para caspasas y proteínas de la familia Bcl-2). Las proteínas se

MATERIAL Y MÉTODOS

transfirieron electroforéticamente a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) y se detectaron mediante quimioluminiscencia mejorada.

Para el fraccionamiento subcelular, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se resuspendieron en tampón a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20 mM HEPES (pH 7.5), 250 mM sacarosa, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA y 1 mM ditioneitol con inhibidores de proteasas (0.1 mM PMSF y 1 mg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina A)]. Después de 15 min en hielo, las células se lisaron pasándolas varias veces a través de una aguja de calibre 22 y el lisado se centrifugó a $1000\times g$ durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este sedimento se utilizó como fracción nuclear. La fracción sobrenadante se centrifugó a $105\ 000\times g$ durante 45 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el sobrenadante resultante se usó como fracción citosólica soluble.

Análisis del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ y determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares

El potencial de membrana mitocondrial y la producción intracelular de ROS se determinaron mediante citometría de flujo utilizando los fluorocromos yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina (JC-1, $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) y diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$, $10\ \mu\text{M}$), respectivamente. La citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro BD FACSVersé™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), algo que se ha descrito en detalle en otro trabajo [22].

Métodos estadísticos

Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron utilizando (i) el t-test de Student (dos muestras) o (ii) el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) (tres o más muestras) con el test de Tukey

MATERIAL Y MÉTODOS

utilizado para comparaciones de medias por pares *a posteriori*. Se utilizó un nivel de significación de $P < 0.05$.

Reactivos

El inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk [benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp(OMe) fluorometil cetona] se adquirió de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). El persulfato de amonio, la acrilamida, la bisacrilamida y la N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina se adquirieron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Las membranas de poli(difluoruro de vinilideno) y el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate se adquirieron de Millipore (Billerica, MA, USA). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, MO, USA).

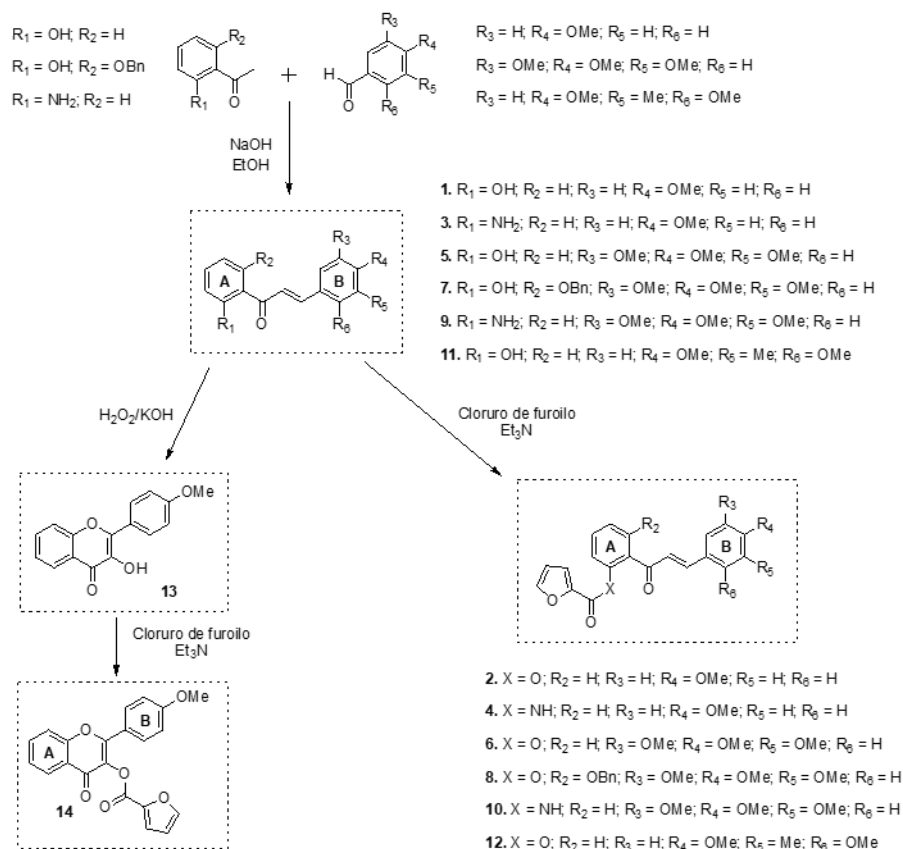
Los anticuerpos primarios utilizados para las inmunotransferencias se obtuvieron de las siguientes empresas (todos se usaron con una dilución de 1:1000): anti-Bak (#12105), anti-Bax (#2772), anti-Bcl-2 (#4223), anti-Bcl-xL (#2764), anti-Bid (#2002), anti-Bim (#2933), anti-caspasa-7 (#9494), anti-caspasa-8 (#9746), anti-caspasa-9 (#9502), anti-Mcl-1 (#4572), anti-JNK/SAPK (#9252), anti-fosfo-JNK/SAPK (fosfo T183 + Y185) (#9251), anti-p44/42 MAP quinasa (ERK1/2) (#9102), antifosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101), anti-p38MAPK (#9212), antifosfo-p38MAPK (T180/Y182) (#9211), anti-p21 (#2947) y anti- α -tubulina (#2125) de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). El anti-caspasa-3 (#ADI-AAP-113) se adquirió de Enzo (Ann Arbor, MI, USA); y el anti-citocromo *c* (556433) y anti-PARP [poli(ADP-ribosa) polimerasa] (#551024) se obtuvieron de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-DR4 (ab8414), anti-DR5 (ab47179) y anti-TRAIL (ab9959) se adquirieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor 594 (#A-11012) se obtuvo de Invitrogen (Eugene, OR, USA). Anti- β -actina (clon AC-74, A2228) se adquirió de

MATERIAL Y MÉTODOS

Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Además, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (NA9310 y NA9340) de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido) a una dilución de 1:10 000.

Síntesis química

En el presente estudio, exploramos los efectos de una colección de 12 chalconas, un flavonol y un derivado del flavonol sobre la viabilidad de las células tumorales humanas.



Esquema 1. Síntesis de chalconas y flavonoles.

Las chalconas (**1-12**) se prepararon de manera sencilla mediante un procedimiento de condensación aldólica estándar que combina tres acetofenonas diferentes con tres benzaldehídos diferentes [23]. Además, el derivado de flavonol **14** se obtuvo mediante una reacción

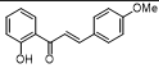
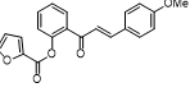
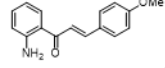
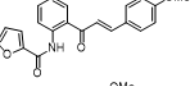
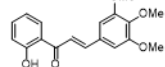
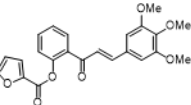
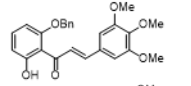
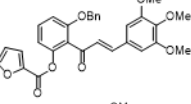
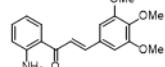
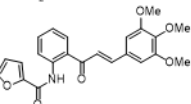
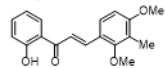
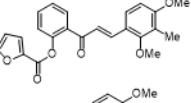
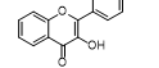
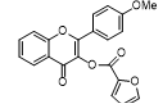
de esterificación a partir del flavonol **13**, que se sintetizó mediante una reacción de ciclación oxidativa del compuesto **1** (Esquema 1).

La evaluación de flavonoides sintéticos revela que la 2'-furoiloxi-4-metoxicalcona inhibe la viabilidad de las células tumorales humanas

La relación estructura/actividad (SARs por sus siglas en inglés) de una serie de chalconas y dos compuestos cíclicos fue investigada de acuerdo con su citotoxicidad potencial frente a células tumorales humanas. Esta serie de compuestos se caracterizó por la ausencia o presencia de un radical furoílo en el anillo A y por un patrón de sustitución diferente en el anillo B del esqueleto de chalcona (Esquema 1). Para ello, se trataron las células tumorales humanas con concentraciones crecientes de cada compuesto y se determinaron los valores de IC_{50} (las concentraciones que inducen una inhibición del 50% de la viabilidad celular) mediante el ensayo del MTT (Tabla 1).

RESULTADOS

Tabla 1. Efectos en la viabilidad celular de los derivados de propenona en células tumorales humanas.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)				
	U-937	HL-60	MOLT-3	SK-MEL-1	MEL-HO
	44.9 ± 4.4	35.2 ± 7.5	23.5 ± 9.9	40.7 ± 10.2	26.8 ± 2.1
	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	12.5 ± 1.5	2.0 ± 0.1
	10.9 ± 2.4	12.4 ± 2.2	7.4 ± 1.1	28.2 ± 4.8	34.2 ± 7.9
	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.6	11.8 ± 3.8
	38.7 ± 8.5	46.6 ± 9.8	12.6 ± 5.8	>100	71.1 ± 19.2
	21.7 ± 12.3	23.1 ± 7.5	11.8 ± 6.7	30.3 ± 7.9	28.2 ± 2.7
	4.1 ± 1.6	5.8 ± 2.2	3.6 ± 0.8	19.3 ± 2.4	11.9 ± 3.4
	5.0 ± 1.6	3.6 ± 1.3	2.8 ± 0.5	17.8 ± 0.4	6.2 ± 1.6
	5.9 ± 1.5	6.3 ± 0.9	6.4 ± 3.0	31.2 ± 3.1	11.6 ± 2.2
	4.2 ± 1.5	26.1 ± 4.9	23.1 ± 8.6	>100	>100
	>100	>100	>100	>100	>100
	7.1 ± 0.6	7.8 ± 1.8	5.8 ± 1.2	>100	>100
	79.7 ± 21.6	55.9 ± 12.9	45.3 ± 10.2	>100	>100
	50.4 ± 7.7	33.1 ± 12.4	5.6 ± 2.9	>100	58.3 ± 26.6

Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante 72 h y los valores de IC₅₀ fueron determinados como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos se expresan como medias ± SEM, y se obtuvieron de las curvas de dosis-respuesta de 3-5 experimentos independientes con tres determinaciones en cada uno.

RESULTADOS

La chalcona **1**, el primer compuesto de esta serie, una chalcona con un sustituyente 4-metoxi, exhibió baja citotoxicidad contra las células tumorales humanas ensayadas. Sin embargo, la introducción de un radical furoílo como éster en la posición 2' del anillo A en el esqueleto de la chalcona, mejoró la citotoxicidad aproximadamente en 200 veces en las células U-937 ($IC_{50} = 0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ frente a $IC_{50} = 44.9 \pm 4.4 \mu\text{M}$ para la chalcona **2** y la chalcona **1**, respectivamente). Este aumento de la actividad citotóxica también se observó en las otras líneas celulares ensayadas. La citotoxicidad aumentó ~100 veces, 40 veces, 3 veces y 14 veces en HL-60, MOLT-3, SK-MEL-1 y MEL-HO, respectivamente. La sustitución del hidroxilo en la posición 2' del anillo A de la chalcona **1** por un grupo amino para generar la chalcona **3** aumentó ~4 veces la citotoxicidad contra U-937 y ~3 veces contra las células HL-60 y MOLT-3. Sin embargo, esta mejora en la citotoxicidad no se observó en las células de melanoma MEL-HO.

La amidación del grupo amino con cloruro de furoílo para producir la chalcona **4** dio como resultado una amplificación de la citotoxicidad. Los valores de IC_{50} fueron ~1 μM en células de leucemia y también en SK-MEL-1. Esta modificación estructural mostró una citotoxicidad distinta contra las células de melanoma. La chalcona amida **4** fue casi 10 veces más citotóxica que el correspondiente éster **2** frente a las células SK-MEL-1 pero no frente a las células MEL-HO.

La inserción de dos grupos metoxi adicionales en la chalcona **1** que establece un sistema 3,4,5-trimetoxi en el anillo B para dar lugar a la chalcona **5** no afectó la citotoxicidad contra las células de leucemia ensayadas, mostrando valores de IC_{50} similares. Por el contrario, esta modificación bloqueó totalmente la citotoxicidad contra las células de melanoma.

La introducción de un éster de furoílo en la chalcona **5** para generar la chalcona **6** aumentó ligeramente la citotoxicidad en todas las líneas celulares ensayadas, excepto en las células MOLT-3 en las que los valores de IC_{50} para **5** y **6** fueron similares. Sin embargo, la chalcona **6**

RESULTADOS

fue mucho menos potente que la chalcona **2**. En comparación con la chalcona **2**, los resultados sugieren que la inserción de dos grupos metoxi donadores de electrones adicionales en las posiciones 3 y 5 del anillo B, conduce a una reducción importante en la actividad antiproliferativa contra las células de leucemia y melanoma. La presencia de un grupo benciloxi en la posición 6' en el anillo A de la chalcona **5** para generar la chalcona **7** aumentó la citotoxicidad contra las células U-937 y HL-60 aproximadamente 10 veces, con aumentos de ~ 4 y ~ 6 veces contra MOLT-3 y células de melanoma, respectivamente. Sin embargo, la introducción de un radical furoílo en la chalcona **7** para generar la chalcona **8** no mejoró la citotoxicidad, a excepción de en MEL-HO, puesto que en esa línea celular aumentó 2 veces con respecto al resultado que arrojó su precursora.

En el caso de las 3,4,5-trimetoxichalconas, la sustitución del 2'-hidroxi en el anillo A del compuesto **5** por un grupo amino, para generar la amino-chalcona **9**, incrementó aproximadamente 7 veces la citotoxicidad frente a las células U-937, HL-60 y MEL-HO. Sin embargo, la introducción de un radical furoílo en el grupo amino (compuesto **10**) tuvo efectos diferentes según la línea celular. Los valores de IC_{50} fueron similares para **9** y **10** en células U-937 y hubo una disminución en la citotoxicidad frente a HL-60, MOLT-3 y células de melanoma.

La Tabla 1 también proporciona información importante sobre la presencia del radical furoílo en el anillo A en la chalcona **11** que contiene un patrón de sustitución de 2,4-dimetoxi-3-metilo en el anillo B. Aunque el compuesto **11** no mostró citotoxicidad frente a las células cancerosas ($IC_{50} > 100 \mu M$), la esterificación del grupo hidroxilo en la posición 2' del anillo A con cloruro de 2-furoílo condujo a un aumento de la citotoxicidad en las tres líneas celulares de leucemia ensayadas (valores de IC_{50} de $7.1 \pm 0.6 \mu M$, $7.8 \pm 1.8 \mu M$ y $5.8 \pm 1.2 \mu M$ para el compuesto **12** en U-937, HL-60 y MOLT-3, respectivamente). Sin

RESULTADOS

embargo, esta modificación no afectó a la citotoxicidad contra las células de melanoma SK-MEL-1 y MEL-HO.

También se exploró el efecto sobre la citotoxicidad de la ciclación de la chalcona **1** para producir el flavonol **13** y su derivado de éster de furoílo **14**. En general, se observó una gran reducción de la citotoxicidad excepto para el compuesto **14** en células de leucemia (Tabla 1). La relación estructura/actividad de los derivados de las chalconas se muestra gráficamente en la Figura 1. Los resultados más relevantes son que la citotoxicidad mejoró por (i) la presencia de un radical furoílo como un éster o una amida, (ii) la sustitución del 2'-hidroxilo por un grupo amino al menos contra células de leucemia humana, y (iii) la presencia de un grupo benciloxi. Sin embargo, la ciclación condujo a una importante reducción de la citotoxicidad.

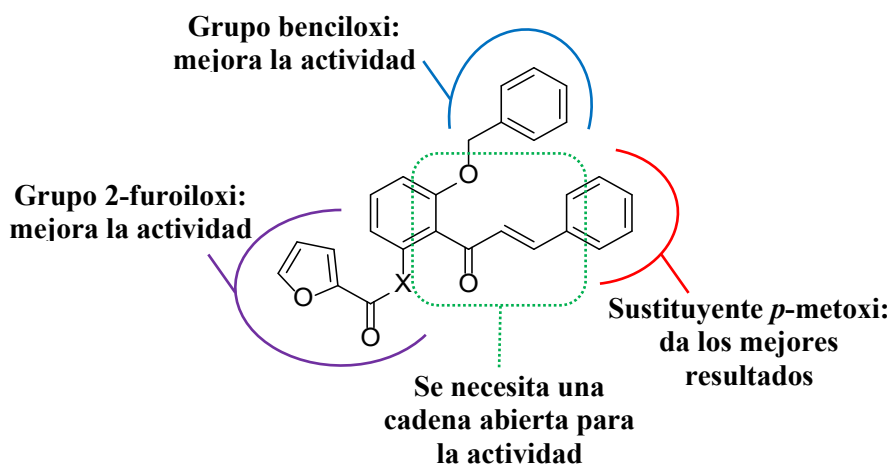


Figura 1. Relación estructura/actividad de los análogos chalcona.

Estos resultados sugieren que el principal determinante de la citotoxicidad en la 4-metoxi-chalcona es la presencia de un radical furoílo en el anillo A, y que uno de los compuestos más citotóxicos fue la chalcona **2** en todas las líneas celulares ensayadas (Tabla 1). En estos experimentos, el agente antineoplásico etopósido se incluyó como

RESULTADOS

control positivo para U-937 ($IC_{50} = 1.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$), HL-60 ($IC_{50} = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$) y MOLT-3 ($IC_{50} = 0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$).

Además, la furoiloxichalcona **2** (FMC) también mostró citotoxicidad significativa frente a la línea celular de leucemia linfoblástica aguda humana, Jurkat y frente a la línea celular de leucemia precursora de células B humana, NALM-6. En dichas líneas, los valores de IC_{50} fueron de $1.5 \pm 1.0 \mu\text{M}$ para Jurkat y $0.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ para NALM-6.

Dado que se constató que el FMC era uno de los compuestos más citotóxicos, se seleccionó para experimentos adicionales utilizando como modelos el linfoma histiocítico humano U-937 y las células de leucemia mieloide humana HL-60. De acuerdo con la inhibición de la viabilidad dependiente de la concentración, FMC indujo cambios morfológicos significativos y provocó una disminución importante en el número de células, como se visualiza mediante microscopía de contraste de fases (Figuras 2a y 2b). Cuando las células U-937 y HL-60 se trataron con FMC ($0.3 \mu\text{M}$) durante 12 días, se inhibió casi por completo la formación y el volumen de las colonias, de forma similar al antitumoral etopósido ($0.2 \mu\text{M}$), que fue utilizado como control positivo (Figura 2c).

RESULTADOS

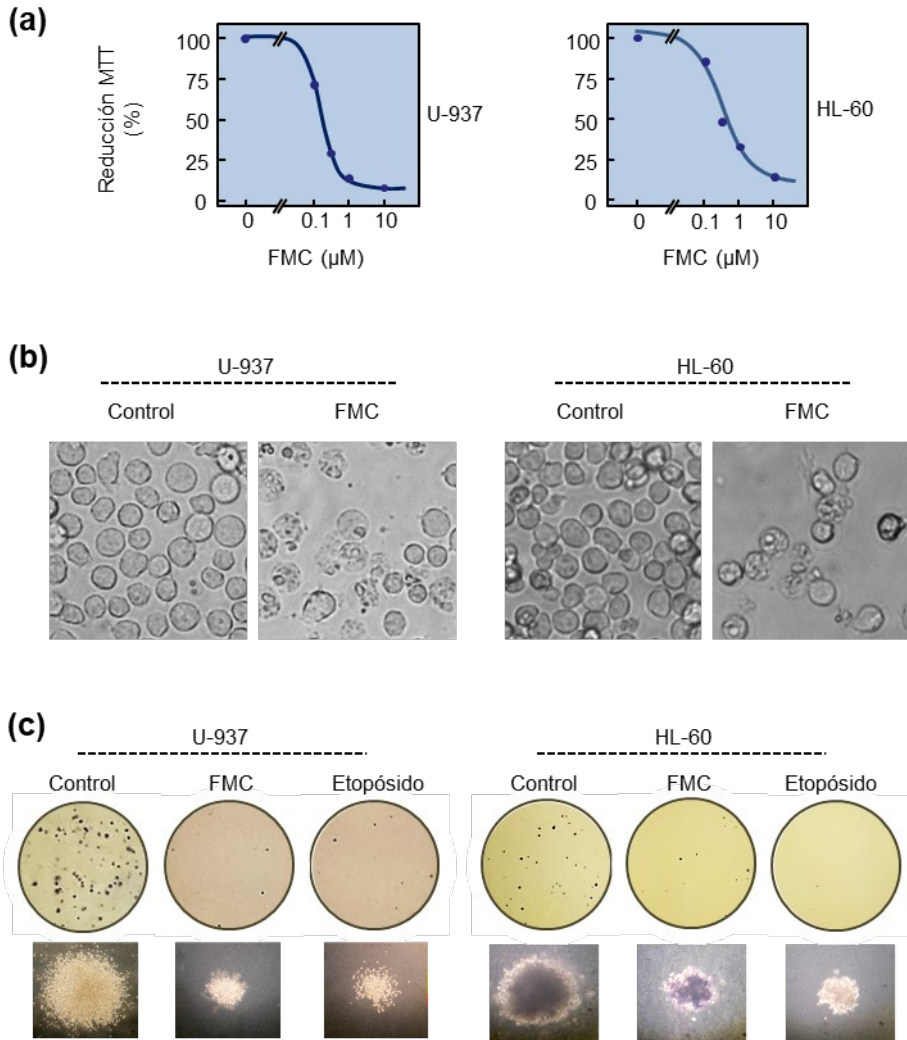


Figura 2. FMC inhibió la viabilidad de las células de leucemia humana U-937 y HL-60. (a) Las células fueron cultivadas con concentraciones crecientes de FMC durante 72 h y la función respiratoria mitocondrial fue determinada por el ensayo de MTT. (b) Las células fueron tratadas con 3 μM de FMC durante 24 h y las imágenes se obtuvieron con un microscopio de contraste de fases invertido; el aumento original fue de 20x. (c) Ensayo de formación de colonias en agar. Las células se plantaron en agar y se trataron con el vehículo (DMSO), 0.3 μM de FMC o 0.2 μM de etopósido durante doce días y se analizó la capacidad de formación de colonias. Se muestran pocillos y colonias representativas visualizadas mediante microscopía de contraste de fases. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

RESULTADOS

Además, las células mononucleares de sangre periférica quiescente humana obtenidas de donantes sanos fueron más resistentes a los efectos de FMC sobre la viabilidad que las células U-937 y HL-60. Aunque los linfocitos en proliferación eran más sensibles que las células mononucleares inactivas, también eran ligeramente más resistentes que las células leucémicas. Además, las células Vero, similares a fibroblastos, mostraron menos citotoxicidad incluso a la concentración de 10 μM de FMC durante 24 h. Estos resultados indican que FMC inhibe la viabilidad de las células leucémicas, mientras que los linfocitos quiescentes normales no mostraron toxicidad apreciable hasta 10 μM de chalcona durante 24 h (Figura 3).

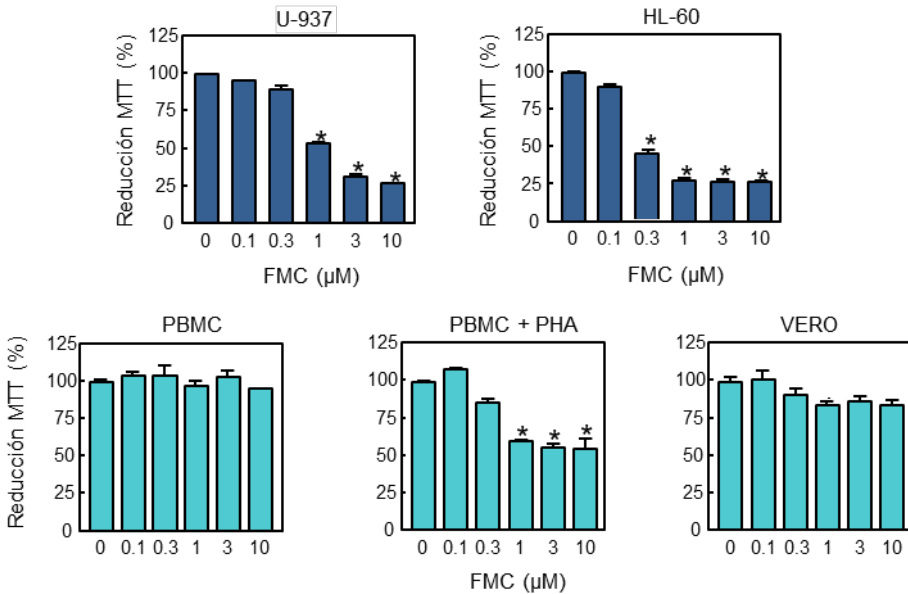


Figura 3. Efecto diferencial de FMC en la viabilidad celular de las células de leucemia humana U-937 y HL-60 *versus* células normales mononucleares de sangre periférica (PBMC), PBMC humanas sanas activadas por fitohemaglutinina (PHA) y células Vero. Las células fueron cultivadas en presencia de las concentraciones indicadas de FMC durante 24 h y la función respiratoria mitocondrial fue determinada por el ensayo de MTT. Los valores representan las medias \pm S.E.M. de tres experimentos independientes cada uno de los cuales llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, significativamente diferente respecto al control sin tratar.

La furoiloxichalcona indujo la parada del ciclo celular en G₂-M y la apoptosis en células de leucemia mieloide humana

Para investigar si la disminución de la viabilidad inducida por FMC fue causada por cambios en las fases del ciclo celular, se incluyeron análisis de citometría de flujo en este estudio. Para ello, se incubaron células U-937 y HL-60 con concentraciones crecientes de FMC durante diferentes periodos de tiempo (6-24 h), se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 4a, una concentración tan baja como 1 μM pudo inducir una parada del ciclo celular en su fase G₂-M después de 6 h de tratamiento en ambas líneas celulares.

El porcentaje de células de control U-937 en fase G₂-M fue de aproximadamente un 20%, que aumentó a 31%, 38% y 35% después del tratamiento con 1 μM , 3 μM y 10 μM de FMC, respectivamente, y esto fue acompañado por una reducción de células en la fase G₁. El aumento de la población celular en fase G₂-M también se observó a las 12 h de tratamiento y este efecto comenzó a disminuir a las 24 h. En las células U-937, el porcentaje de sub-G₁ (es decir, células apoptóticas) aumentó hasta el 14.3 % (~4 veces), el 20.2 % (10 veces) y el 53.3 % (23 veces) con 3 μM de FMC después de 6, 12 y 24 h de tratamiento, respectivamente.

Resultados similares se obtuvieron en las células HL-60. El porcentaje de células HL-60 en G₂-M fue ~20 %, que aumentó a 33 % y 43 % después de 6 y 12 h de tratamiento con 3 μM de FMC, respectivamente. Esta parada en G₂-M disminuyó después de 24 h de tratamiento y se asoció con un aumento de cincuenta veces en el porcentaje de células sub-G₁ (1.1% frente a 54.8%). Los histogramas representativos de la citometría de flujo después del marcaje con yoduro de propidio se muestran en la Figura 4a.

RESULTADOS

Tabla 2. Efectos de FMC en la distribución en las fases del ciclo celular de las células de leucemia humana.

	FMC (μ M)	%Sub-G ₁	%G ₁	%S	%G ₂ -M	
<u>U-937</u>	6 h	0	3.8 ± 1.1	51.9 ± 1.6	24.2 ± 2.1	19.9 ± 0.7
		1	15.7 ± 0.3	26.0 ± 0.8*	26.6 ± 0.3	31.2 ± 0.3*
		3	14.3 ± 0.9*	19.0 ± 1.5*	27.7 ± 0.6	38.2 ± 2.5*
		10	13.6 ± 1.1*	20.6 ± 0.6*	29.4 ± 0.3*	35.4 ± 0.8*
	12 h	0	2.1 ± 0.4	48.5 ± 1.1	25.1 ± 0.7	22.2 ± 0.6
		1	18.8 ± 0.3*	12.4 ± 2.5*	22.5 ± 0.9	43.4 ± 1.7*
		3	20.2 ± 1.6*	7.7 ± 0.7*	24.7 ± 1.2	44.4 ± 1.1*
		10	17.2 ± 0.1*	10.2 ± 0.4*	26.6 ± 0.5	43.0 ± 0.4*
	24 h	0	2.3 ± 0.4	53.1 ± 1.6	23.8 ± 0.6	19.2 ± 1.1
		1	11.3 ± 2.7*	36.1 ± 2.2*	28.4 ± 0.3*	20.2 ± 0.6
		3	53.3 ± 5.1*	22.1 ± 2.0*	14.0 ± 2.1*	6.7 ± 1.6*
		10	58.2 ± 3.3*	15.5 ± 1.6*	12.8 ± 1.9*	10.7 ± 0.6*
HL-60	6 h	0	2.9 ± 0.7	44.3 ± 0.0	31.2 ± 0.2	21.5 ± 0.4
		1	7.1 ± 0.9	24.3 ± 0.1*	35.3 ± 0.2	33.0 ± 0.8*
		3	7.2 ± 1.4*	22.4 ± 0.5*	36.3 ± 1.8	33.9 ± 0.0*
		10	6.3 ± 0.4*	24.3 ± 2.3*	35.6 ± 0.6	33.4 ± 2.0*
	12 h	0	2.6 ± 0.2	48.3 ± 0.5	29.3 ± 0.5	19.2 ± 0.4
		1	11.2 ± 1.5	18.6 ± 2.8	31.6 ± 0.9	37.4 ± 0.7*
		3	13.2 ± 1.0*	8.5 ± 0.4*	33.5 ± 1.6*	43.8 ± 0.2*
		10	11.6 ± 3.0*	9.9 ± 0.4*	32.6 ± 0.2*	45.1 ± 3.6*
	24 h	0	1.1 ± 0.2	52.7 ± 0.2	30.2 ± 0.7	15.7 ± 0.7
		1	16.6 ± 3.3*	50.7 ± 1.3	21.5 ± 1.1*	10.8 ± 0.9
		3	54.8 ± 0.9*	17.8 ± 2.1*	10.2 ± 0.8*	16.4 ± 2.0
		10	59.4 ± 1.6*	14.7 ± 0.1*	9.3 ± 0.1*	15.9 ± 1.6

Las células fueron incubadas con las concentraciones especificadas de FMC durante periodos de tiempo crecientes y la distribución en las fases del ciclo celular fue determinada por citometría de flujo. Los valores son medias \pm S.E.M. de dos experimentos independientes con tres determinaciones en cada uno. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0.05$) respecto a los controles correspondientes.

Dado que FMC causó la detención del ciclo celular en la fase G₂-M, se investigó su efecto sobre la polimerización de tubulina, utilizando para ello un ensayo *in vitro* y monitorizando el aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción. Los resultados demostraron que FMC inhibía

RESULTADOS

la polimerización de tubulina de forma dependiente de la concentración. En estos experimentos se usaron colchicina (5 μM) y taxol (10 μM) como controles positivos de inhibición y promoción de la polimerización de tubulina, respectivamente (Figura 4b). El valor IC_{50} para la inhibición de la polimerización de tubulina (definido como la concentración del compuesto que inhibió el grado de ensamblaje en un 50 % después de 20 min de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$) fue de $4.9 \pm 1.3 \mu\text{M}$ (media \pm S.E.M.; $n = 3$).

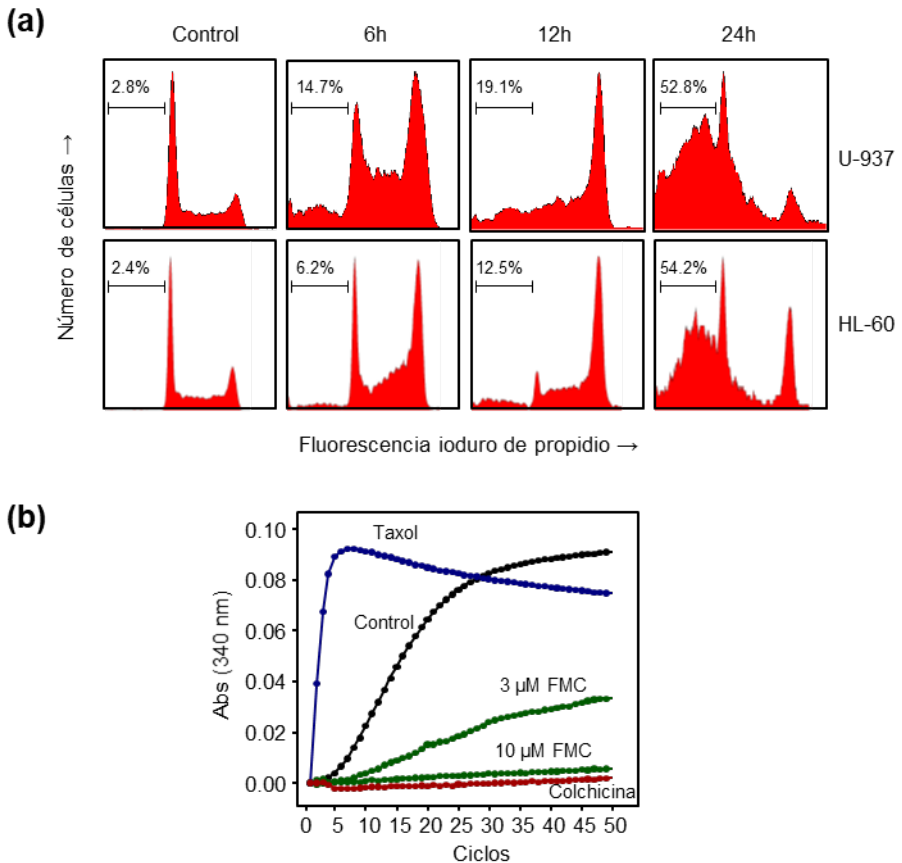


Figura 4. FMC indujo cambios en el ciclo celular e inhibió la polimerización de tubulina. (a) Las células fueron cultivadas con 3 μM de FMC durante períodos crecientes de tiempo, marcadas con yoduro de propidio y sometidas a citometría de flujo. Las células apoptóticas se muestran en la región señalada con una barra. (b) FMC inhibió la polimerización de tubulina. Tubulina de cerebro bovino purificada fue incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ en ausencia (control) o en presencia de colchicine (5 μM), taxol (10 μM) o las concentraciones especificadas de FMC, y la absorbancia a 340 nm se midió en un lector de placas.

RESULTADOS

Para demostrar que FMC interfiere con la red de microtúbulos, esta se analizó por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal de α -tubulina. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento con FMC interrumpió la red de tubulina de manera similar a la colchicina (0.1 μ M). Como se esperaba, el taxol (0.2 μ M) aumentó la polimerización y densidad de los microtúbulos celulares. Estos resultados indican que FMC inhibió la polimerización de microtúbulos en células de leucemia.

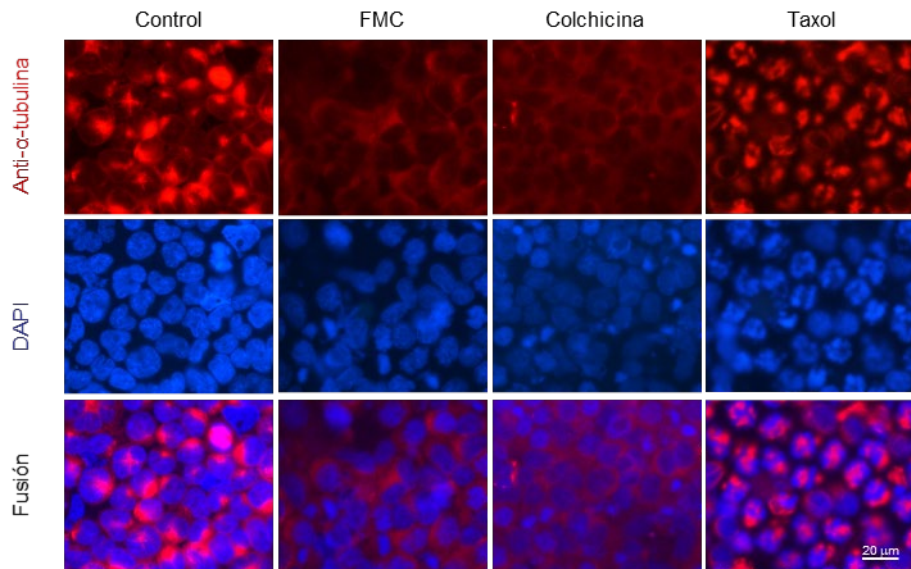


Figura 5. FMC inhibió la polimerización de los microtúbulos. En la figura se muestran los efectos de FMC en la organización de la red celular de microtúbulos. Las células HL-60 se incubaron con 3 μ M de FMC durante 12 h, se recogieron y se fijaron. Luego se incubaron con un anticuerpo anti- α -tubulina monoclonal y después con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594. La red celular de microtúbulos se analizó usando un microscopio de fluorescencia Nikon. Colchicina (0.1 μ M) y taxol (0.2 μ M) se usaron como controles positivos para la despolimerización y polimerización de los microtúbulos, respectivamente. El marcaje nuclear se llevó a cabo con 1.5 μ g/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Aumento original: 40x.

Para explorar si el mecanismo molecular de la parada del ciclo celular en G₂-M, inducido por FMC en células de leucemia, implica la inducción del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21^{Cip1/WAF1}, se realizaron experimentos de respuesta a la dosis y a la exposición

RESULTADOS

temporal y se midieron los niveles de p21^{Cip1/WAF1} por *Western blot*. Como se muestra en la Figura 6, FMC indujo p21^{Cip1/WAF1} de una manera dependiente de la concentración y el tiempo de incubación en ambas líneas celulares. La cuantificación de la apoptosis obtenida mediante la determinación del porcentaje de células en sub-G₁ por citometría de flujo, revela que los niveles máximos de inducción de la apoptosis se obtuvieron después del tratamiento con FMC 3 μ M durante 24 h en ambas líneas celulares (Tabla 2, Figura 7a).

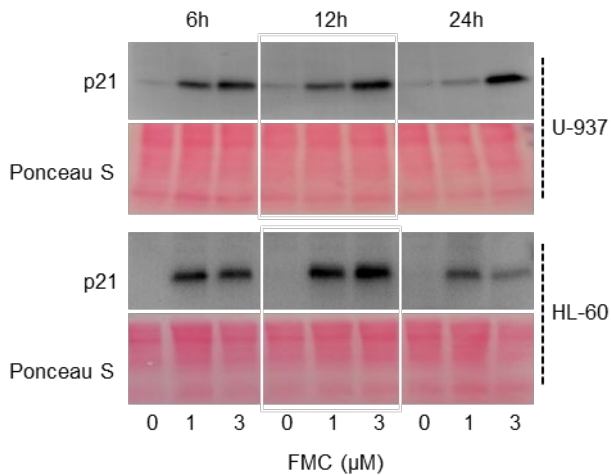


Figura 6. Las células se cultivaron con las concentraciones señaladas de FMC durante los períodos indicados y los lisados nucleares se analizaron mediante transferencia *Western*. La tinción con Ponceau S se usó como control de carga y transferencia. Se muestra una sección representativa.

Los núcleos de las células tratadas (3 μ M FMC, 24 h) visualizados por microscopía de fluorescencia después de la tinción con Hoechst 33258 revelaron condensación y fragmentación de la cromatina (Figura 7b). Además, el porcentaje de células apoptóticas, determinado por la evaluación por citometría de flujo del número de células positivas para anexina V-FITC (Figura 7c), aumentó quince veces en las células U-937 tratadas con FMC 3 μ M durante 24 h, y cuatro veces en células HL-60 (Figura 7d). Estos resultados indican que FMC induce la parada del

RESULTADOS

ciclo celular en la fase G₂-M y la apoptosis en células U-937 y HL-60 de leucemia mieloide humana.

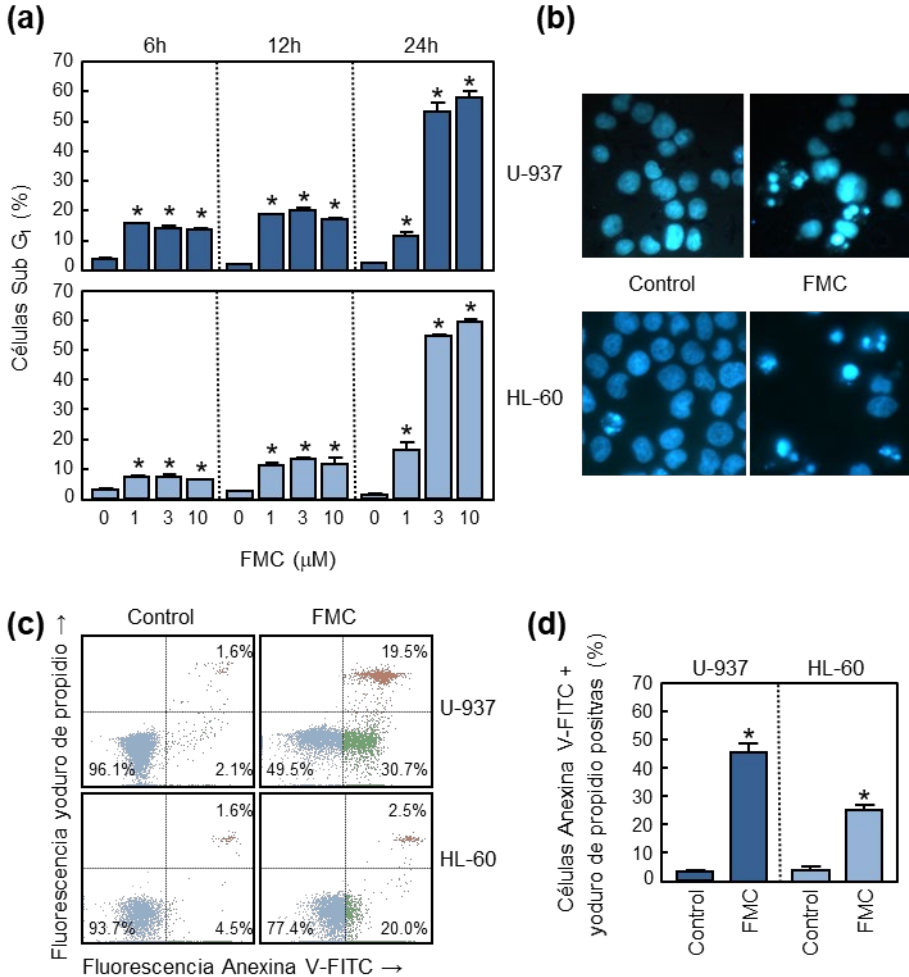


Figura 7. FMC indujo apoptosis en las células U-937 y HL-60. (a) Las células se trataron con las concentraciones señaladas de FMC durante los períodos indicados y la apoptosis fue cuantificada por citometría de flujo como el porcentaje de células sub-G₁. Los valores representan medias ± SEM de dos experimentos independientes cada uno de ellos llevados a cabo por triplicado. **P* < 0.05, significativamente diferente respecto al control sin tratar. (b) Fotomicrografías de campos representativos de células tratadas con 3 μM de FMC durante 24 h y teñidas con Hoechst 33258. (c) Las células se trataron como en (b), se marcaron doblemente con Anexina V-FITC y yoduro de propidio y se sometieron a un análisis por citometría de flujo. (d) Las células se trataron como en (c) y se cuantificaron por citometría de flujo. Las barras representan medias ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. **P* < 0.05, significativamente diferente respecto al control sin tratar.

Activación de caspasas y escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa inducidas por la furoiloxichalcona

Para explorar si el mecanismo de muerte celular provocado por FMC en células de leucemia humana estaba asociado con la activación de las caspasas, se analizó la actividad enzimática de los lisados celulares con sustratos tetrapéptidicos específicos después del tratamiento con FMC 3 μ M durante diferentes períodos de tiempo. Como se muestra en la Figura 8, los valores de actividad máxima para caspasa-3/7, -8 y -9 se obtuvieron después de 24 h de tratamiento con FMC en células U-937 y HL-60.

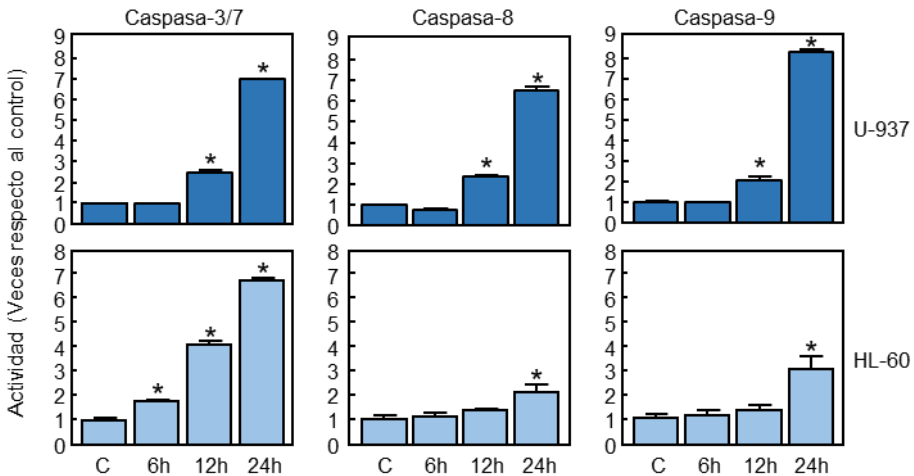


Figura 8. FMC indujo la activación de caspasas en células U-937 y HL-60. Cinéticas de la activación de las caspasas. Las células se trataron con 3 μ M de FMC, durante los tiempos indicados y los lisados totales de las mismas se ensayaron para determinar la actividad caspasa usando los sustratos cromogénicos DEVD-pNA (para la caspasa-3/7), IETD-pNA (para la caspasa-8), y LEHD-pNA (para la caspasa-9). Los resultados se expresan como número de veces que se incrementa la actividad enzimática respecto al control. Los valores representan medias \pm SEM de dos experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, significativamente diferente respecto al control sin tratar.

Para determinar si la chalcona inducía la escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), que se considera un sello distintivo de la apoptosis y que indica la activación de caspasas, se analizaron las

fracciones nucleares de las células tratadas mediante inmunotransferencia. Como puede verse, el fragmento de 85 kDa generado a partir de la proteína PARP se detectó en células tratadas con FMC después de 6 h de exposición a una concentración tan baja como 1 μ M y aumentó de manera dependiente de la concentración y el tiempo (Figura 9).

El procesamiento de las caspasas en células tratadas con FMC se analizó mediante inmunotransferencia para definir la relación temporal de activación de caspasas y escisión de PARP. Las caspasas ejecutoras -3 y -7 fueron procesadas y detectadas por la generación de un fragmento y la disminución de la proenzima, respectivamente. La disminución de procaspasa-7 fue más evidente en U-937 que en HL-60. También se examinó la caspasa-4 que está involucrada en la inflamación y se detectó una disminución de la proenzima después del tratamiento con 3 μ M de FMC en ambas líneas celulares. Las caspasas iniciadoras también se procesaron y el procesamiento de la procaspasa-9 fue anterior al de la procaspasa-8. El procesamiento de la caspasa-9, detectado como una disminución de la proenzima, se observó a las 6 h, mientras que la disminución de las proenzimas procaspasa-8 y -7 se detectó a las 12 h de tratamiento, al menos en las células U-937 donde la escisión de PARP fue más evidente. Los niveles de procesamiento de procaspasa-9 alcanzaron su punto máximo a las 6 h, mientras que para la procaspasa-3 fue a las 24 h.

Estos patrones proteolíticos sugieren que la escisión inicial de PARP antes de la escisión de caspasa-3 podría atribuirse a la escisión de caspasa-9/caspasa-7, y luego la activación de caspasa-3 podría amplificar la hidrólisis de PARP.

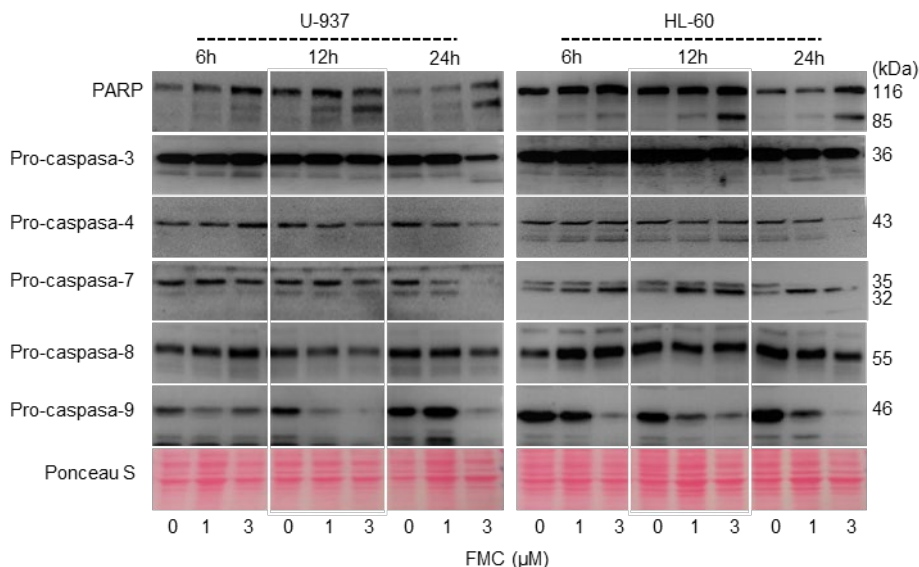


Figura 9. FMC indujo la activación de caspasas en células U-937 y HL-60. Evolución temporal de la escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y el procesamiento de las procaspasas. Las células se incubaron en las condiciones de tiempo y concentración de FMC indicadas y las proteínas fueron analizadas mediante *Western blot*. La tinción con Ponceau S se usó como control de carga y transferencia.

Para determinar si la muerte celular provocada por FMC podía bloquearse con un inhibidor general de las caspasas, las células U-937 se trataron previamente con z-VAD-fmk (100 μM) y luego con la chalcona durante 24 h y se analizaron por citometría de flujo después de la doble tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Los resultados revelaron que el inhibidor disminuyó el porcentaje de células positivas para anexina V-FITC, así como el porcentaje de células positivas para yoduro de propidio (Figura 10a). Como se muestra en la Figura 10b, el porcentaje de células positivas para anexina V-FITC más yoduro de propidio fue de $4.3 \pm 0.3 \%$ en las células control, y aumentó hasta $50.0 \pm 5.0 \%$ después del tratamiento con FMC, mientras que el incremento fue notablemente inferior ($22.4 \pm 7.3 \%$) en presencia de z-VAD-fmk, es decir, con la combinación (z-VAD-fmk + FMC).

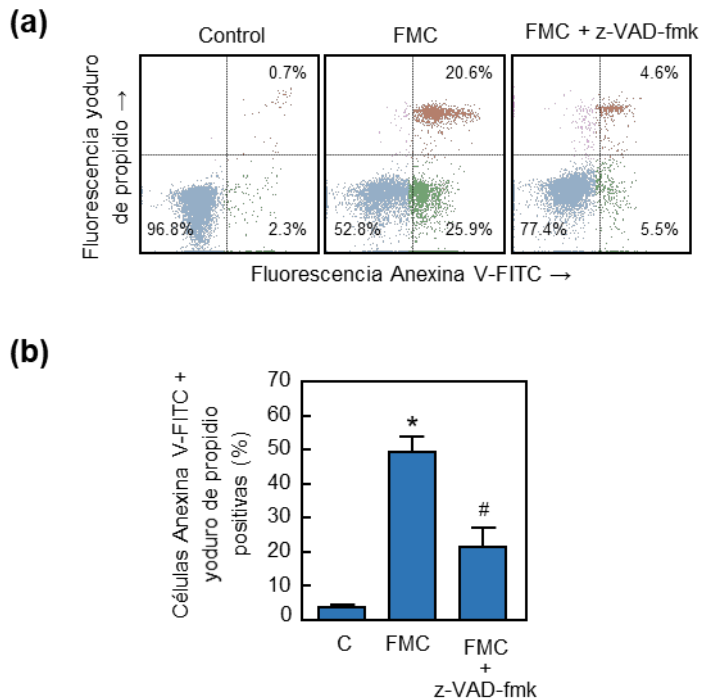


Figura 10. (a) Las células U-937 se trataron con FMC (3 μM , 24 h) en ausencia o presencia de z-VAD-fmk (100 μM) y sometidas a citometría de flujo después de un marcaje doble con anexina V-FITC y yoduro de propidio. (b) Las células U-937 se trataron como en (a) y se cuantificaron por citometría de flujo. Las barras representan medias \pm SEM de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $P < 0.05$, respecto al control sin tratar. # $P < 0.05$ significativamente diferente respecto al tratamiento con FMC.

La furoiloxichalcona indujo la liberación de citocromo *c* pero no disminuyó el potencial de membrana mitocondrial

La activación de la caspasa-9 depende de la liberación de citocromo *c* de la mitocondria al citosol. Para determinar si la muerte celular inducida por FMC implica la liberación de citocromo *c*, se realizaron experimentos de dosis-respuesta y con diferentes tiempos de incubación y se analizaron las fracciones citosólicas mediante inmunotransferencia. Como se muestra en la Figura 11a, se detectó un aumento de citocromo *c* en el citosol a partir de las 6 h de tratamiento con una concentración baja de FMC (1 μM) en ambas líneas celulares,

RESULTADOS

U-937 y HL-60. Para investigar si se requiere una interrupción del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) para la liberación de citocromo *c*, las células se trataron con vehículo (DMSO) o con concentraciones crecientes de FMC durante 6 h, se tiñeron con el fluorocromo JC-1 y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados mostraron que el $\Delta\Psi_m$ permaneció intacto durante al menos 6 h de tratamiento, lo que sugiere que la disipación del potencial de la membrana mitocondrial no estuvo implicada en la muerte celular inducida por FMC (Figura 12).

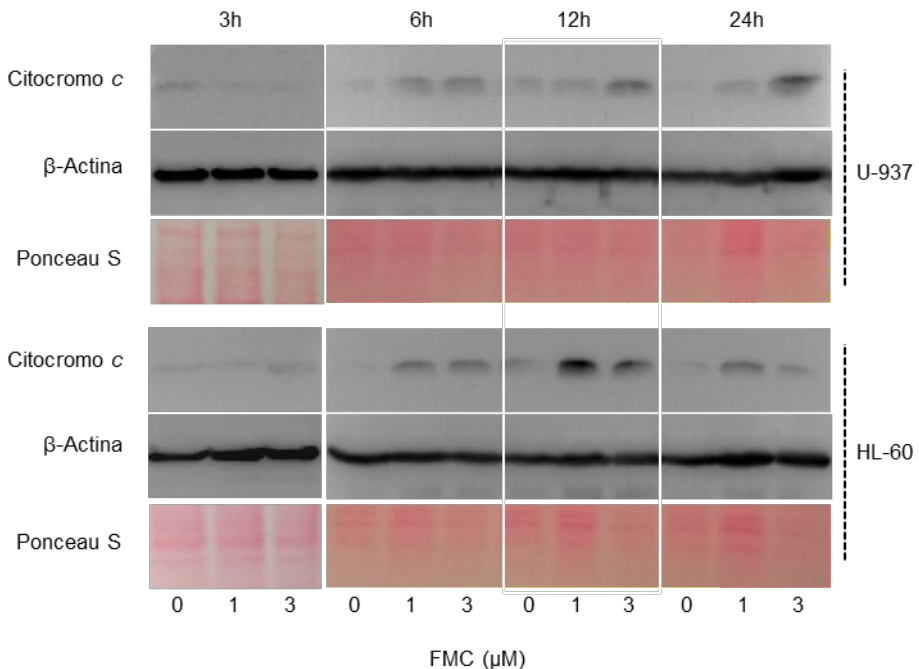


Figura 11. FMC indujo la liberación de citocromo *c*. *Inmunoblots* representativos muestran la liberación del citocromo *c* por FMC de manera dependiente del tiempo y de la concentración. Las células se cultivaron con FMC durante los períodos de tiempo indicados y las fracciones citosólicas se analizaron mediante *Western blots* con anticuerpos específicos para citocromo *c* y β -actina, que fue usada como control de carga. Una igual carga de proteínas fue también controlada por la tinción de las membranas con Ponceau S antes de la inmunodetección.

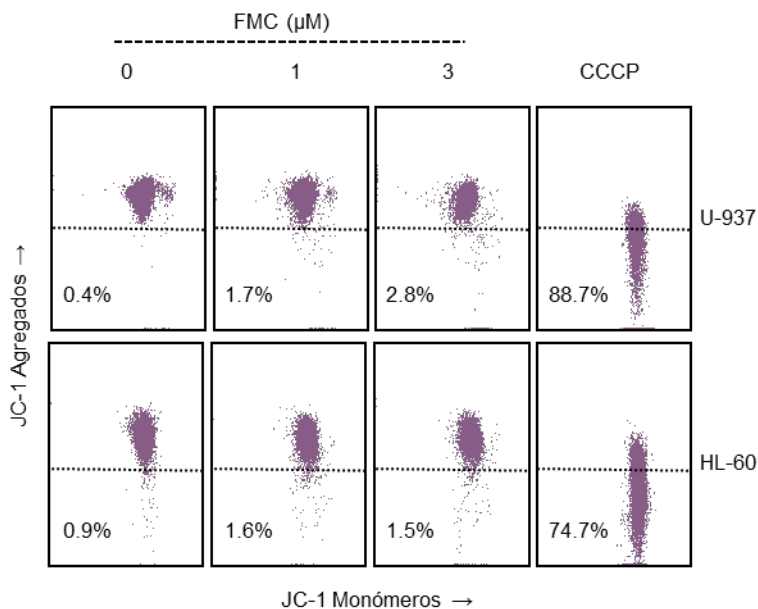


Figura 12. FMC no afectó al potencial de membrana mitocondrial. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de FMC durante 6 h, marcadas con la sonda JC-1 y el $\Delta\Psi_m$ se analizó por citometría de flujo. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes cada uno de los cuales llevados a cabo por triplicado. El protonóforo CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona, 50 μM) se usó como control positivo.

La expresión de niveles elevados de Bcl-2 confiere protección contra la apoptosis inducida por la furoiloxichalcona

Para confirmar el papel clave de la vía intrínseca en el mecanismo de muerte celular inducida por FMC, comparamos el efecto sobre la inducción de apoptosis en células U-937 que expresan niveles elevados de Bcl-2 (U-937/Bcl-2) y las células U-937 parentales. Como se muestra en la Figura 13a, los experimentos de dosis-respuesta revelaron que la expresión de niveles elevados de Bcl-2 suprimió casi por completo el aumento en el porcentaje de células sub-G₁ después de 24 h de tratamiento. Sin embargo, las células U-937/Bcl-2 fueron sensibles

a la parada del ciclo celular en la fase G₂-M inducida por FMC (Figura 13b).

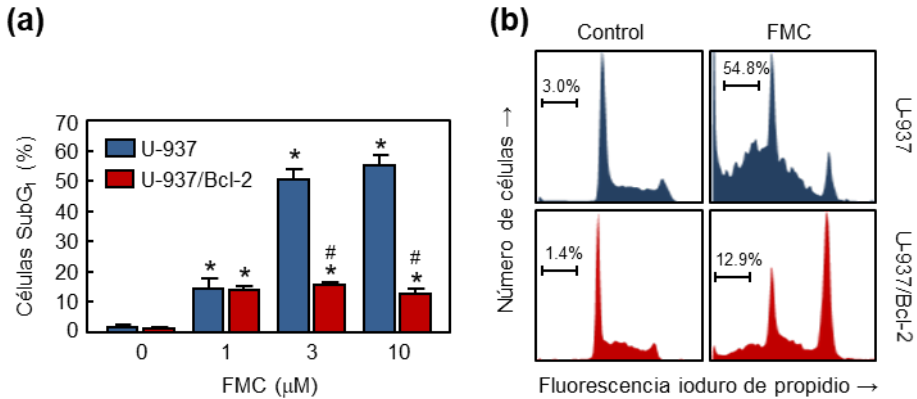


Figura 13. La expresión de niveles elevados de Bcl-2 bloqueó la apoptosis inducida por FMC. (a) Las células se cultivaron con las concentraciones especificadas de FMC durante 24 h y el ciclo celular se analizó por citometría de flujo. (b) Se muestran histogramas representativos y el porcentaje de células sub-G₁ (células apoptóticas) después del tratamiento con 3 μM durante 24 h. * $P < 0.05$ respecto al control sin tratar. # $P < 0.05$ significativamente diferente respecto al tratamiento con FMC.

El efecto de FMC sobre la viabilidad celular también se evaluó en ambas líneas celulares y, en consonancia con los resultados anteriores, la reducción en el número de células fue mayor en U-937 que en U-937/Bcl-2 (Figura 14a). La disminución del número de células respecto al control en U-937/Bcl-2 puede ser consecuencia de la parada del ciclo celular en G₂-M, ya que en estas condiciones el porcentaje de células viables era del 96 %. El agente citotóxico ara-C (1-β-D-arabinofuranosilcitosina), que induce la muerte celular a través de la vía mitocondrial, provocó una mayor disminución del número de células en U-937 en comparación con U-937/Bcl-2. Los cambios morfológicos y la disminución en el número de células por FMC se visualizaron claramente mediante microscopía de contraste de fase (Figura 14b).

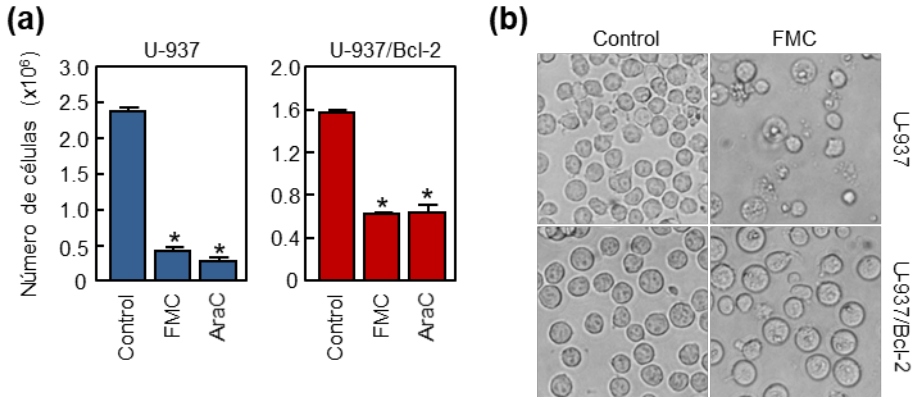


Figura 14. La expresión de niveles elevados de Bcl-2 bloqueó la apoptosis inducida por FMC. (a) Efectos diferenciales en el número de células después del tratamiento con 3 μ M de FMC durante 24 h. Se incluyó como control positivo ara-C (1- β -D-arabinofuranosilcitosina, 1 μ M, 24h). (b) Microfotografías obtenidas con un microscopio de contraste de fases invertido después del tratamiento con 3 μ M de FMC durante 24 h. *P < 0.05 respecto al control sin tratar.

La furoiloxichalcona regula negativamente a Bcl-xL y Mcl-1 y aumenta los niveles de DR5

Para determinar si la inhibición de la viabilidad desencadenada por FMC estaba asociada con cambios en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, las células se incubaron con concentraciones crecientes de la chalcona durante tiempos variables (6-24 h) y los lisados celulares totales (o la fracción citosólica en el caso de Bax) se analizaron por inmunotransferencia. Como se muestra en la Figura 15, se detectó una disminución de los niveles de Bcl-xL, Mcl-1 y Bax citosólico después de 24 h de tratamiento con FMC. Aunque no se observaron cambios en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, los niveles del factor proapoptótico Bak aumentaron a las 6 h de tratamiento al menos en células U-937, mientras que los miembros proapoptóticos Bid y Bim disminuyeron. Además, también se exploró la expresión de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) y los receptores de muerte que están implicados en la vía extrínseca de la muerte celular. Como se muestra en la Figura 15, FMC

RESULTADOS

no logró afectar los niveles de expresión de TRAIL y pareció disminuir los niveles de DR4 al menos en las células U-937. Curiosamente, DR5 aumentó en respuesta al tratamiento con FMC en ambas líneas celulares.

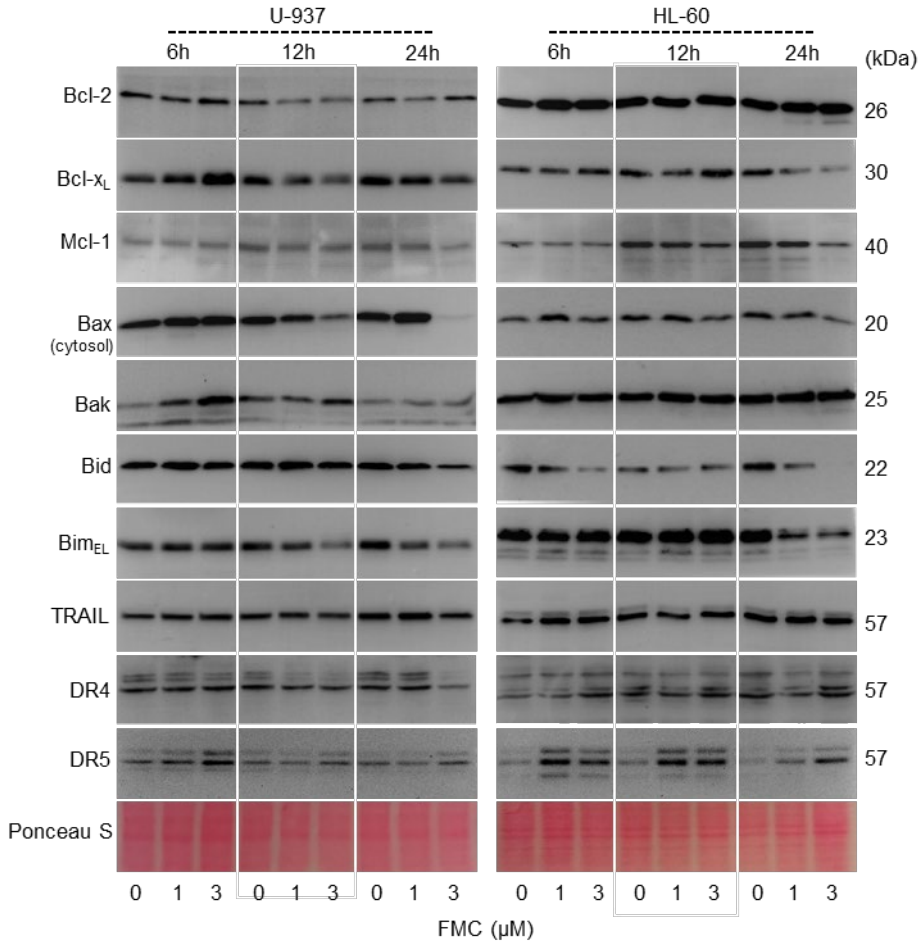


Figura 15. FMC indujo cambios en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, TRAIL y Receptores de Muerte (DR). Las células se trataron con las concentraciones indicadas de FMC durante los tiempos especificados y los lisados celulares totales o las fracciones citosólicas (en el caso de Bax) se analizaron por *immunoblotting*. Como control de carga y transferencia se usó Ponceau S. Se muestra una sección representativa de las membranas.

La furoiloxichalcona aumentó la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular fue bloqueada por la catalasa y se asoció con la activación de la vía MAPK

Un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede inducir la muerte en las células leucémicas [24]. Para explorar si FMC induce ROS en U-937 y HL-60, las células se trataron con la chalcona, se tiñeron con la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF) y se analizaron por citometría de flujo. Un aumento en la fluorescencia de DCF se detectó en las células tratadas con FMC, como pudo verse por el desplazamiento hacia la derecha del histograma correspondiente (Figura 16a).

Para investigar si el estrés oxidativo desencadenado por FMC es esencial en la muerte celular mediada por FMC, las células se trataron previamente con catalasa (500 unidades/mL), uno de los antioxidantes más importantes que tiene un papel crucial en la degradación de H₂O₂. Como se muestra, esta enzima fue capaz de bloquear en gran parte el aumento del porcentaje de células sub-G₁ y la generación de ROS (Figuras 16b y 16c). Además, se observó que la catalasa bloquea, al menos parcialmente, la reducción en el número de células provocada por FMC (Figura 16d).

RESULTADOS

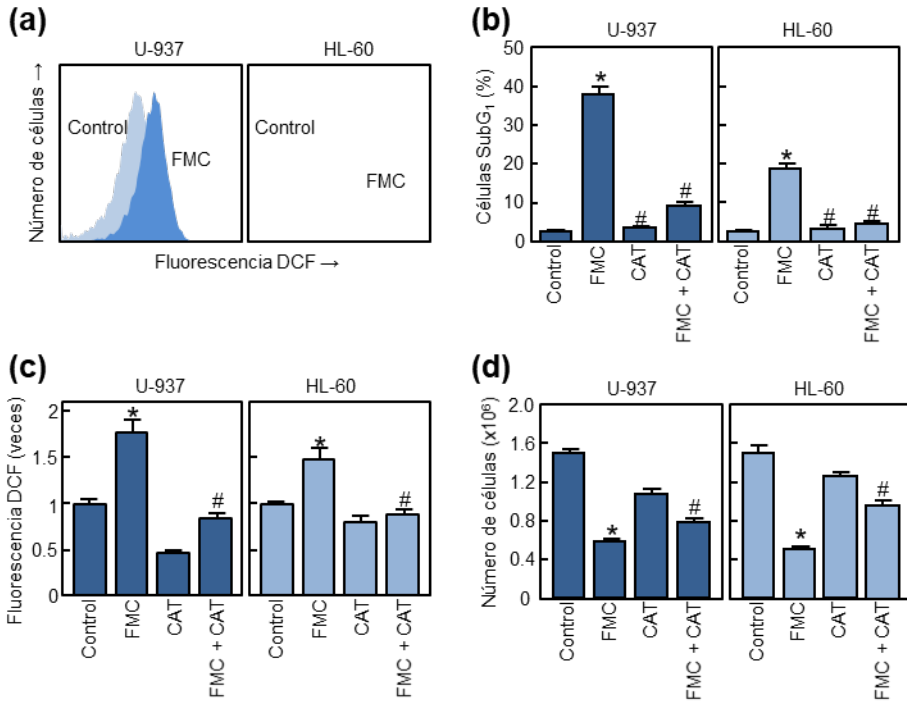


Figura 16. FMC indujo generación de ROS. (a) Histogramas representativos de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo después del tratamiento con 3 μM de FMC durante 3 h. (b) Las células se preincubaron con catalase (CAT, 500 UI/mL) durante 1 h, luego se trataron durante 24 h con 3 μM de FMC y el porcentaje de células sub-G₁ se determinó por citometría de flujo. (c) Las células se preincubaron con catalase durante 1 h y luego con 3 μM de FMC durante 3 h y la fluorescencia del H₂DCF oxidado se determinó por citometría de flujo. (d) Las células se trataron como en (b) y el número de células se determinó por el método de exclusión del azul de tripán. * $P < 0.05$ respecto al control sin tratar. # $P < 0.05$ significativamente diferente respecto al tratamiento con FMC.

Dado que el aumento en la generación de ROS en las células leucémicas conduce a la activación de la cascada de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) [24-27], también se investigó la posibilidad de que FMC pudiera activar esta vía. Como se muestra (Figura 17), esta chalcona conduce a la fosforilación de *c*-jun *N*-terminal quinasas/proteínas quinasa activadas por estrés (JNK/SAPK) y p38^{MAPK} en células U-937 y HL-60, mientras que la fosforilación de las quinasas

RESULTADOS

reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) solo se observó en células U-937.

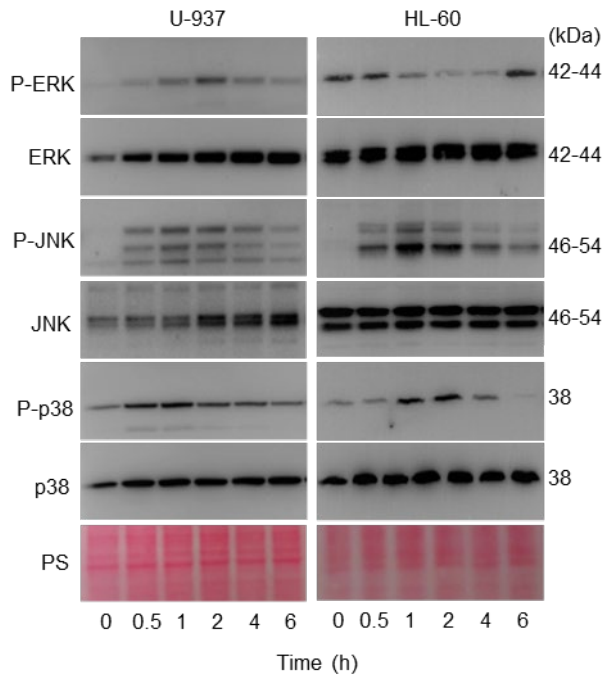


Figura 17. FMC induce la activación de MAPK. Las células se trataron con 3 μM de FMC durante los tiempos indicados y la fosforilación de MAPK se detectó por *immunoblotting*. Las membranas se sometieron a *stripping* y se volvieron a marcar con anticuerpos contra ERK total, JNK total o p38 total como controles de carga. La tinción con Ponceau S (PS) se usó también como control alternativo de carga, así como como control para la transferencia.

Se han descrito pocos ejemplos de chalconas que contengan el radical furoiloxi y que exhiban actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerosas y, además, muestren baja citotoxicidad contra células normales [28]. Además, las chalconas que contienen anillos aromáticos específicos se han probado como inhibidores de ABCG2 (casete de unión a ATP G2) [29]. Por el contrario, se ha descrito que los metoxiflavonoides son inhibidores más potentes de la proliferación de células cancerosas que sus correspondientes análogos no metoxilados [30]. La presencia de grupos metoxi o algunos restos lipofílicos en flavonoides específicos confiere hidrofobicidad y aumenta significativamente la potencia y biodisponibilidad y también mejora la estabilidad y eficacia al prevenir la hidrólisis química y metabólica [31-34].

En el presente estudio, intentamos encontrar nuevas moléculas antiproliferativas potentes inspiradas en productos naturales. Concretamente, se sintetizaron doce chalconas y dos compuestos cíclicos y se evaluó la actividad citotóxica potencial frente a células tumorales humanas. La introducción de un heterociclo de furoilo como un éster o una amida mejoró o mantuvo la citotoxicidad en la mayoría de las líneas de células tumorales y, en algunos casos, el aumento observado en la actividad fue muy significativo (compuestos **2** y **4**). Curiosamente, la falta de disponibilidad de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el OH y el grupo cetona conduce a un aumento de la citotoxicidad. Esto sugiere que el grupo cetona estaría libre para interactuar con un sitio de unión específico. Este hecho abre nuevas vías de investigación para desentrañar el mecanismo de acción.

Los resultados revelaron que una 4-metoxichalcona específica, que contenía un radical furoiloxi en la posición 2' del anillo A (FMC) era el compuesto más citotóxico, con valores de IC_{50} de $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ y $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ contra células U -937, HL-60 y MOLT-3, respectivamente. Curiosamente, la línea celular de melanoma MEL-HO también fue sensible a los efectos antiproliferativos de esta chalcona.

Las células de leucemia humana U-937 y HL-60 fueron más sensibles a FMC que las PBMC no proliferativas y las células Vero, similares a fibroblastos, según lo determinado por el ensayo del MTT. Esta chalcona fue capaz de inducir una rápida parada del ciclo celular en la fase G₂-M, a partir de las 6 h, evento que fue seguido por un aumento en el porcentaje de células sub-G₁.

La parada en G₂-M desencadenada por FMC podría explicarse por una inhibición de la polimerización de tubulina o por cambios en la expresión y/o actividad de los reguladores del ciclo celular de G₂-M. La tubulina es ampliamente reconocida como una diana molecular atractiva para posibles agentes anticancerígenos. Algunos flavonoides exhiben su actividad antiproliferativa al interferir en la formación de los microtúbulos a través de su unión a la tubulina [35]. Se ha descrito también la capacidad de ciertos flavonoides naturales y sintéticos para bloquear la polimerización de tubulina [36-38].

Aquí se presentan evidencias de que FMC inhibe la polimerización de tubulina de una manera dependiente de la concentración. Este resultado indica que FMC podría unirse a la tubulina para exhibir citotoxicidad. Curiosamente, esta chalcona fue capaz de inducir el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (Cdk) p21^{Cip1/WAF1}, lo que sugiere una relación entre la parada en G₂-M y la inducción de muerte celular. Se necesitarán estudios futuros para determinar el efecto de FMC en reguladores del ciclo celular G₂-M adicionales como Cdk1, isoformas de ciclina tipo B y la fosfatasa Cdc25C.

La chalcona sintética indujo la activación y procesamiento de caspasas iniciadoras y ejecutoras en células U-937 y HL-60. La relación temporal entre la activación de las caspasas y la escisión de PARP sugiere que la hidrólisis inicial de PARP podría deberse a la escisión de caspasa-9/caspasa-7, seguida de la activación de caspasa-3 que podría amplificar el procesamiento de PARP.

La muerte celular inducida por FMC es dependiente de las caspasas ya que el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, fue capaz de disminuir significativamente el porcentaje de células positivas para anexina V-FITC al menos en las células U-937.

La furoiloxichalcona FMC también indujo la liberación temprana de citocromo *c* (6 h) y este evento no estuvo acompañado por la disipación del potencial transmembrana mitocondrial. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en líneas celulares, que indican que los eventos mitocondriales asociados con cambios en el $\Delta\Psi_m$ no son necesarios para la liberación completa del citocromo *c* tras el aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial [39]. La apoptosis puede ocurrir sin una disipación completa del potencial de membrana mitocondrial, tal y como se ha descrito en células CEM [40]. La ausencia de una disminución paralela en el $\Delta\Psi_m$ y la liberación de citocromo *c* observada en las células HL-60 y U-937 podría explicarse por la posibilidad de que no todo el citocromo *c* mitocondrial participe activamente en la cadena de transporte de electrones, como ha sido sugerido previamente por Bossy-Wetzel *et al.* [40]. No se puede descartar que FMC promueva la disipación del $\Delta\Psi_m$, particularmente a tiempos más prolongados de tratamiento.

La expresión de niveles elevados de la proteína antiapoptótica Bcl-2 bloqueó la muerte celular desencadenada por FMC, lo que sugiere que la propia Bcl-2 podría ser una diana potencial en el mecanismo de la muerte celular. Aunque FMC no bloqueó la expresión de la proteína Bcl-2, la furoiloxichalcona disminuyó los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL y Mcl-1 después de 24 h de tratamiento.

Además, los niveles citosólicos de Bax disminuyeron, lo que sugiere una translocación de Bax a la membrana externa mitocondrial de acuerdo con la inducción de la apoptosis. Los experimentos de inmunotransferencia revelaron una disminución en los niveles de Bid que podría deberse al truncamiento de Bid de longitud completa por la

activación y el procesamiento de la caspasa-8. La activación de esta caspasa iniciadora está mediada por la unión del ligando a los receptores de muerte y la activación de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral que contiene el dominio de muerte. Los resultados revelaron que FMC es un inductor de DR5 y puede tener una importancia clínica potencial; sin embargo, se necesita más investigación para determinar si esta chalcona puede amplificar la sensibilidad a TRAIL.

La generación de ROS provoca estrés oxidativo y muerte celular [41]. En este trabajo, demostramos que FMC aumentó los niveles de ROS en las células U-937 y HL-60. Aunque no hemos identificado la fuente primaria de ROS, demostramos que la generación de ROS fue un evento temprano ya que se detectó después de 3 h de tratamiento con FMC. En cambio, la liberación de citocromo *c* no se detectó hasta las 6 h de tratamiento. Los experimentos de la cinética de la liberación de citocromo *c* en ambas líneas celulares revelaron la ausencia de citocromo *c* en el citosol de las células U-937 y HL-60 a las 3 h de tratamiento. Por lo tanto, la generación de ROS parece no ser una consecuencia de la liberación de citocromo *c*.

Curiosamente, la generación de ROS, así como el aumento en el porcentaje de células sub-G₁, fue revertido por la enzima antioxidante catalasa, lo que sugiere que el estrés oxidativo desencadenado por FMC está involucrado en el mecanismo de muerte celular.

Además, FMC pudo activar la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que está involucrada en la proliferación, supervivencia y muerte celular [42]. Específicamente, FMC indujo la fosforilación y activación de JNK/SAPK y p38^{MAPK} en ambas líneas celulares. Serán necesarios futuros experimentos para determinar el papel de estas proteínas quinasas en el mecanismo de muerte celular.

CONCLUSIONES

En resumen, se diseñaron y se sintetizaron una serie de chalconas y dos compuestos cíclicos con o sin un radical furoilo y evaluamos su citotoxicidad frente a cinco líneas de células tumorales humanas.

Las relaciones de estructura/actividad revelaron que (i) la presencia de un grupo 2'-amino en la 4-metoxichalcona generó un compuesto más citotóxico que el 2'-hidroxi correspondiente frente a las células leucémicas, y la introducción de un radical furoilo en la posición 2' como un éster o un grupo amida potenció la citotoxicidad frente a contra las células de leucemia y melanoma; y (ii) la sustitución de 2'-hidroxi por un grupo 2'-amino en las 3,4,5-trimetoxichalconas potenció la citotoxicidad frente a las células de leucemia y melanoma, pero los derivados de furoilo correspondientes no aumentaron la citotoxicidad como en el caso de las 4-metoxichalconas.

La 4-metoxichalcona que contiene un radical furoiloxi en 2' en el anillo A (FMC) fue uno de los compuestos citotóxicos más potentes de esta serie contra las células de leucemia humana U-937, HL-60, MOLT-3 y la línea celular de melanoma humano MEL-HO. Curiosamente, FMC mostró menos potencial citotóxico contra las células normales, como las células mononucleares de sangre periférica humana y las células Vero, similares a fibroblastos, lo que sugiere que este compuesto puede tener potencial terapéutico.

FMC detuvo las células en la fase G₂-M, indujo el inhibidor del ciclo celular p21^{Cip1/WAF1} e inhibió la polimerización de tubulina. La muerte celular inducida por FMC se asoció con la activación de caspasas, la escisión de PARP, la liberación de citocromo *c* de las mitocondrias, la inducción del Receptor de Muerte 5 y cambios en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2. Además, la expresión de niveles elevados de la proteína antiapoptótica Bcl-2 bloqueó el aumento en el porcentaje de células sub-G₁. El mecanismo de muerte celular pareció estar relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS),

CONCLUSIONES

ya que FMC indujo especies reactivas de oxígeno y la enzima antioxidante catalasa podía bloquear las ROS y la muerte celular.

CONCLUSIONS

- In summary, we have evaluated the potential cytotoxicity of 12 chalcones and two cyclic compounds, and the SARs revealed:
 - The presence of a 2' amino group in 4-methoxychalcone generated a more cytotoxic compound than the corresponding 2'-hydroxy against leukemic cells, and the introduction of a furoyl radical in position 2' as an ester or an amide group enhanced the cytotoxicity against leukaemia and melanoma cells.
 - The substitution of 2'-hydroxy for a 2'-amino group in 3,4,5-trimethoxychalcones enhanced the cytotoxicity against leukaemia and melanoma cells but the corresponding furoyl derivatives did not enhance the cytotoxicity as in the case of 4-methoxychalcones.
- The 4-methoxychalcone containing a furoyloxy radical at 2' on the A ring (FMC) was the most potent cytotoxic compound against U-937, HL-60, MOLT-3 and MEL-HO.
- FMC showed less cytotoxic potential against normal cells, as the human peripheral blood mononuclear cells and the fibroblast-like Vero cells.
- FMC arrested the cells in the G2-M phase, induced the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 and inhibited the polymerization of tubulin.
- Cell death induced by FMC was associated with caspase activation, PARP cleavage, cytochrome *c* release from mitochondria, induction of the Death Receptor 5 and changes in Bcl-2 family proteins expression.

CONCLUSIONS

- The over-expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 blocked the increase in the percentage of sub-G1 cells.
- The mechanism of cell death appeared to be related to the generation of reactive oxygen species (ROS) since FMC induced ROS and the antioxidant enzyme catalase was able to block ROS and cell death.

- [1] K.D. Miller, M. Fidler-Benaoudia, T.H. Keegan, H.S. Hipp, A. Jemal, R.L. Siegel, Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. *CA Cancer J. Clin.* 70 (2020) 443-459, <https://doi.org/10.3322/caac.21637>.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209-249, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [3] K.D. Miller, L. Nogueira, A.B. Mariotto, J.H. Rowland, K.R. Yabroff, C.M. Alfano, A. Jemal, J.L. Kramer, R.L. Siegel, Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 69 (2019) 363-385, <https://doi.org/10.3322/caac.21565>.
- [4] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495-516, <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [5] O. Julien, J.A. Wells, Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 24 (2017) 1380-1389, <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>.
- [6] B.A. Carneiro, W.S. El-Deiry, Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17 (2020) 395-417, <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- [7] L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E.S. Alnemri, L. Altucci et al., Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25 (2018) 486-541, <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- [8] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83 (2020) 770-803, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

- [9] E.R. Sauter, Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 13 (2020) 265-285, <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218>.
- [10] D. Ravishankar, A.K. Rajora, F. Greco, H.M. Osborn, Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 2821-2831, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>.
- [11] D. Raffa, B. Maggio, M.V. Raimondi, F. Plescia, G. Daidone, Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Eur. J. Med. Chem.* 142 (2017) 213-228, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034>.
- [12] C. Forni, M. Rossi, I. Borromeo, G. Feriotto, G. Platamone, C. Tabolacci, C. Mischiati, S. Beninati, Flavonoids: A Myth or a Reality for Cancer Therapy?. *Molecules* 26 (2021) 3583, <https://doi.org/10.3390/molecules26123583>.
- [13] S. Shukla, A.K. Sood, K. Goyal, A. Singh, V. Sharma, N. Guliya, S. Gulati, S. Kumar, Chalcone Scaffolds as Anticancer Drugs: A Review on Molecular Insight in Action of Mechanisms and Anticancer Properties. *Anticancer Agents Med. Chem.* 21 (2021) 1650-1670, <https://doi.org/10.2174/1871520620999201124212840>.
- [14] Y. Ouyang, J. Li, X. Chen, X. Fu, S. Sun, Q. Wu, Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. *Biomolecules* 11 (2021) 894, <https://doi.org/10.3390/biom11060894>.
- [15] K.C. Nicolaou, J.A. Pfefferkorn, H.J. Mitchell, A.J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, J.E. Lillig, Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 2. Construction of a 10 000-Membered Benzopyran Library by Directed Split-and-Pool Chemistry Using NanoKans and Optical Encoding. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 9954-9967, <https://doi.org/10.1021/ja002034c>.
- [16] M.D. Delost, D.T. Smith, B.J. Anderson, J.T. Njardarson, From oxiranes to oligomers: architectures of U.S. FDA approved

pharmaceuticals containing oxygen heterocycles. *J. Med. Chem.* 61 (2018) 10996–11020, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00876>.

[17] P.A. Wender, V.A. Verma, T.J. Paxton, T.H. Pillow, Function-oriented synthesis, step economy, and drug design. *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 40-9, <https://doi.org/10.1021/ar700155p>.

[18] P. Harris, P. Ralph, Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines, *J. Leukoc. Biol.* 37 (1985) 407-422, <https://doi.org/10.1002/jlb.37.4.407>.

[19] W. Chanput, V. Peters, H. Wichers, THP-1 and U937 Cells, in: K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, Springer, 2015, pp. 147-159.

[20] E. Saavedra, H. Del Rosario, I. Brouard, J. Quintana, F. Estévez, 6'-Benzyloxy-4-bromo-2'-hydroxychalcone is cytotoxic against human leukaemia cells and induces caspase-8- and reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 298 (2019) 137-145, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.12.010>.

[21] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

[22] F. Estévez-Sarmiento, E. Hernández, I. Brouard, F. León, C. García, J. Quintana, F. Estévez, 3'-Hydroxy-3,4'-dimethoxyflavone-induced cell death in human leukaemia cells is dependent on caspases and reactive oxygen species and attenuated by the inhibition of JNK/SAPK. *Chem. Biol. Interact.* 288 (2018) 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.04.006>.

[23] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, Z. Miao, Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* 117 (2017) 7762-7810, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>.

- [24] S. Zhuang, J.T. Demirs, I.E. Kochevar, p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 275:25939-25948, <https://doi.org/10.1074/jbc.M001185200>.
- [25] M. Watabe, H. Kakeya, H. Osada, Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis. *Oncogene* 18 (1999) 5211-5220, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202901>.
- [26] S.G. Shiah, S.E. Chuang, Y.P. Chau, S.C. Shen, M.L. Kuo, Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res.* 59 (1999) 391-398.
- [27] Y.R. Chen, W. Wang, A.N. Kong, T.H. Tan, Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1769-1775, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1769>.
- [28] D. Cao, X. Han, G. Wang, Z. Yang, F. Peng, L. Ma, R. Zhang, H. Ye, M. Tang, W. Wu, K. Lei, J. Wen, J. Chen, J. Qiu, X. Liang, Y. Ran, Y. Sang, M. Xiang, A. Peng, L. Chen, Synthesis and biological evaluation of novel pyranochalcone derivatives as a new class of microtubule stabilizing agents. *Eur. J. Med. Chem.* 62 (2013) 579-589, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.007>.
- [29] S. Kraege, K. Stefan, S.C. Kçhler, M. Wiese, Optimization of acryloylphenylcarboxamides as inhibitors of ABCG2 and comparison with acryloylphenylcarboxylates. *ChemMedChem* 11 (2016) 2547-2558, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600455>.
- [30] T. Walle, N. Ta, T. Kawamori, X. Wen, P.A. Tsuji, U.K. Walle, Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones. *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 1288-1296, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.12.028>.

- [31] T. Walle, Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass?. *Semin. Cancer Biol.* 17 (2007) 354-362, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.05.002>.
- [32] A.A. Sy-Cordero, T.N. Graf, S.P. Runyon, M.C. Wani, D.J. Kroll, R. Agarwal, S.J. Brantley, M.F. Paine, S.J. Polyak, N.H. Oberlies, Enhanced bioactivity of silybin B methylation products. *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 742-747, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.035>.
- [33] F. Grande, O.I. Parisi, R.A. Mordocco, C. Rocca, F. Puoci, L. Scrivano, A.M. Quintieri, P. Cantafio, S. Ferla, A. Brancale, C. Saturnino, M.C. Cerra, M.S. Sinicropi, T. Angelone, Quercetin derivatives as novel antihypertensive agents: Synthesis and physiological characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 82 (2016) 161-170, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.021>.
- [34] M.K. Kim, K.S. Park, C. Lee, H.R. Park, H. Choo, Y. Chong, Enhanced stability and intracellular accumulation of quercetin by protection of the chemically or metabolically susceptible hydroxyl groups with a pivaloxymethyl (POM) promoiety. *J. Med. Chem.* 53 (2010) 8597-8607, <https://doi.org/10.1021/jm101252m>.
- [35] J.A. Beutler, E. Hamel, A.J. Vlietinck, A. Haemers, P. Rajan, J.N. Roitman, J.H. 2nd Cardellina, M.R. Boyd, Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2333-2338, <https://doi.org/10.1021/jm970842h>.
- [36] F. Estévez-Sarmiento, M. Said, I. Brouard, F. León, C. García, J. Quintana, F. Estévez, 3'-Hydroxy-3,4'-dimethoxyflavone blocks tubulin polymerization and is a potent apoptotic inducer in human SK-MEL-1 melanoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 6060-6070, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.043>.
- [37] S. Rubio, J. Quintana, J.L. Eiroa, J. Triana, F. Estévez, Betuletol 3-methyl ether induces G₂-M phase arrest and activates the sphingomyelin and MAPK pathways in human leukemia cells. *Mol. Carcinog.* 49 (2010) 32-43, <https://doi.org/10.1002/mc.20574>.

- [38] F. Torres, J. Quintana, F. Estévez, 5,7,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway. *Mol. Carcinog.* 49 (2010) 464-475, <https://doi.org/10.1002/mc.20619>.
- [39] J.C. Goldstein, C. Muñoz-Pinedo, J.E. Ricci, S.R. Adams, A. Kelekar, M. Schuler, R.Y. Tsien, D.R. Green, Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ.* 12 (2005) 453-462, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401596>.
- [40] E. Bossy-Wetzel, D.D. Newmeyer, D.R. Green, Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17 (1998) 37-49, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.37>.
- [41] J.N. Moloney, T.G. Cotter, ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80 (2018) 50-64, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.
- [42] Q. Peng, Z. Deng, H. Pan, L. Gu, O. Liu, Z. Tang, Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer. *Oncol. Lett.* 15 (2018) 1379-1388, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7491>.

El trabajo recogido en esta tesis se ha reflejado en la siguiente comunicación y en la publicación del artículo que se incluye a continuación.

Comunicación

Título: *Structure-activity relationships reveal a 2'-furoyloxychalcone as a potent cytotoxic and apoptosis inducer in human U-937 leukaemia cells*

Autores: *del Rosario H, Saavedra E, Brouard I, González-Santana D, García C, Quintana J, Estévez F.*

Congreso: *II Bio.Natural-Bioactive Natural Products Research Meeting (Bio.Natural-2021)*

Lugar: *Lisboa (Portugal)*

Entidad organizadora: *USG-United Scientific Group, Universidade Lusófona*

Fecha: *18-19 noviembre 2021*

Nacional / Internacional: *Internacional*



Structure-activity relationships reveal a 2-furoyloxychalcone as a potent cytotoxic and apoptosis inducer for human U-937 and HL-60 leukaemia cells

Henoc del Rosario^a, Ester Saavedra^{a,b}, Ignacio Brouard^c, Daniel González-Santana^{c,d},
Celina García^e, Elena Spínola-Lasso^a, Carlos Tabraue^f, José Quintana^a, Francisco Estévez^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Grupo de Química Orgánica y Bioquímica, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Unidad Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

^b Instituto Canario de Investigación del Cáncer, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

^c Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPNA-CSIC), 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

^d Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

^e Instituto Universitario de Bio-organica AG, Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

^f Departamento de Morfología, Grupo de Investigación Medio Ambiente y Salud (GIMAS), Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Apoptosis
Structure-activity relationship
Caspase
Cell cycle
Cytotoxicity
Chalcone, Furoyloxychalcone

ABSTRACT

Synthetic flavonoids with new substitution patterns have attracted attention as potential anticancer drugs. Here, twelve chalcones were synthesized and their antiproliferative activities against five human tumour cells were evaluated. This series of chalcone derivatives was characterized by the presence of an additional aromatic or heterocyclic ring linked by an ether, in the case of a benzyl radical, or an ester or amide functional group in the case of a furoyl radical. In addition, the influence on cytotoxicity by the presence of one or three methoxy groups or a 2,4-dimethoxy-3-methyl system on the B ring of the chalcone scaffold was also explored. The results revealed that the most cytotoxic chalcones contain a furoyl substituent linked by an ester or an amide through the 2'-hydroxy or the 2'-amino group of the A ring of the chalcone skeleton, with IC₅₀ values between 0.2 ± 0.1 μM and 1.3 ± 0.1 μM against human leukaemia cells. The synthetic chalcone 2'-furoyloxy-4-methoxychalcone (FMC) was, at least, ten-fold more potent than the antineoplastic agent etoposide against U-937 cells and displayed less cytotoxicity against human peripheral blood mononuclear cells. Treatment of U-937 and HL-60 cells with FMC induced cell cycle arrest at the G₂-M phase, an increase in the percentage of sub-G₁ and annexin-V positive cells, the release of mitochondrial cytochrome c, activation of caspase and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. In addition, it inhibited tubulin polymerization *in vitro* in a concentration dependent manner. Cell death triggered by this chalcone was decreased by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk and was dependent of the generation of reactive oxygen species. We conclude that this furoyloxychalcone may be useful in the development of a potential anti-leukaemia strategy.

1. Introduction

Leukaemia is among the most commonly diagnosed cancers in adolescents and continues to be the leading cancer cause of death in the

group aged 15 to 29 years [1]. In accordance with the GLOBOCAN database estimates of incidence and mortality worldwide for 2020, the estimated numbers of new cases and deaths from leukaemia were 474,519 and 311,594, respectively, emphasizing that mortality rates for

Abbreviations: CAT, catalase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FMC, furoyloxymethoxychalcone; IC₅₀, 50% inhibition of cell growth; JNK/SAPK, c-jun N-terminal kinases / stress-activated protein kinases; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MEK, mitogen-activated extracellular kinases; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; p38^{MAPK}, p38 mitogen-activated protein kinases; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author.

E-mail address: francisco.estevez@ulpgc.es (F. Estévez).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105926>

Received 7 March 2022; Received in revised form 25 May 2022; Accepted 1 June 2022

Available online 11 June 2022

0045-2068/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

this heterogeneous group of diseases are still very high [2], and requiring novel therapies to increase the efficacy.

Acute myeloid leukaemia is one of the most common leukaemias diagnosed in adults. The 5-year relative survival for children and adolescents is 67% but declines to 7% for patients aged 65 years and older [3]. Molecular targeted drugs and immunotherapies have improved the survival for hematopoietic and lymphoid malignancies but resistance to conventional therapies is one of the main limitations for treatment. The evasion of apoptosis is considered one of the mechanisms of resistance to conventional treatments against cancer. Apoptosis is a kind of regulated cell death, which results in targeted elimination of cells with minimal inflammatory response [4]. This cellular death is catalysed by the proteolytic activity of caspases, a family of cysteine-aspartate proteases which are expressed in cells as zymogens known as procaspases. These enzymes predominantly cleave their substrates on the C-terminal side of an aspartate residue [5]. Proteolytic cleavage leads to important biochemical and morphology changes such as phosphatidylserine exposure at the cell surface, plasma membrane blebbing, chromatin condensation, nuclear fragmentation and formation of apoptotic vesicles. Two main apoptotic pathways have been described, the intrinsic and the extrinsic pathways [6]. The intrinsic or mitochondrial pathway is initiated by perturbations of the intracellular or extracellular micro-environment, characterized by mitochondrial outer membrane permeabilization, cytosolic release of apoptogenic factors and caspase-3 activation. The extrinsic pathway is initiated from cell membrane proteins named as death receptors and characterized by caspase-8 activation and proteolytic maturation of executioner caspases, mainly caspase-3 [7].

Natural products represent realistic options as potential anticancer agents [8,9]. Flavonoids are plant polyphenolic metabolites which exhibit remarkable pharmacological activities [10,11]. These compounds are able to interfere in every phase of cancer progression by modulating key proteins involved in angiogenesis, apoptosis, differentiation, metastasis, proliferation and reverse multidrug resistance process [12]. In particular, the acyclic version of flavonoids, chalcones, are very simple small molecules with a privileged structure that exhibit relevant cytotoxicity against various cancer cells and low cytotoxicity against human normal cells [13,14]. Many natural products contain furan which is a relevant building block in the development of new therapies [15] and appears in 10 drugs approved by the FDA [16].

The aim of this study was (i) to synthesize a series of lineal chalcone derivatives together with two cyclic compounds containing electron donating groups (MeO- and Me-) on the B ring and (ii) to explore the effect of the presence of a furyl substituent on the A ring of the chalcone skeleton on cytotoxicity against several human tumour cells. The basis for the design of these compounds is the application of the function-oriented synthesis (FOS) concept, a step-economic strategy directed to the synthesis of simple compounds with superior activity [17]. We have explored the influence of different substituents on both rings of the chalcone skeleton. These included (i) the presence of a hydroxyl group on the A ring or a benzyl radical, (ii) a furan ring linked by an ester or amide bond and (iii) the presence of a 4-methoxy or 3,4,5-trimethoxy or 2,4-dimethoxy-3-methyl systems on the B ring. In addition, we explored the signal transduction pathways of cell death triggered by 2'-furyloxy-4-methoxychalcone, one of the most cytotoxic compounds against human U-937 and HL-60 leukaemia cells. These cell lines were selected as they are frequently used in biomedical research for the study of therapeutics and neoplasia and have made important contributions to the disciplines of immunology, hematology and cancer [18,19].

2. Results

2.1. Chemistry

In the present study, we explored the effects of a collection of 12 chalcones, a flavonol and a flavonol derivative on viability of human

tumor cells. The chalcones (1–12) were prepared in a straightforward manner by a standard aldolic condensation procedure combining three different acetophenones with three different benzaldehydes [20]. Additionally, flavonol derivative 14 was obtained through an esterification reaction from flavonol 13 which was synthesized by oxidative cyclization reaction of compound 1 (Scheme 1).

2.2. Biology

2.2.1. Screening of synthetic flavonoids reveals that 2'-furyloxy-4-methoxychalcone inhibits the viability of human tumour cells

The SARs (structure–activity relationship) of a series of chalcones and two cyclic compounds were investigated for its potential cytotoxicity against human tumour cells. This series of compounds was characterized for the absence or the presence of a furyl radical on the A ring and by a different substitution patterns on the B ring of the chalcone skeleton (Scheme 1). To this end, human tumour cells were treated with increasing concentrations of each compound and the IC₅₀ values (the concentrations that induce a 50% inhibition of cell viability) were determined by the MTT assay (Table 1).

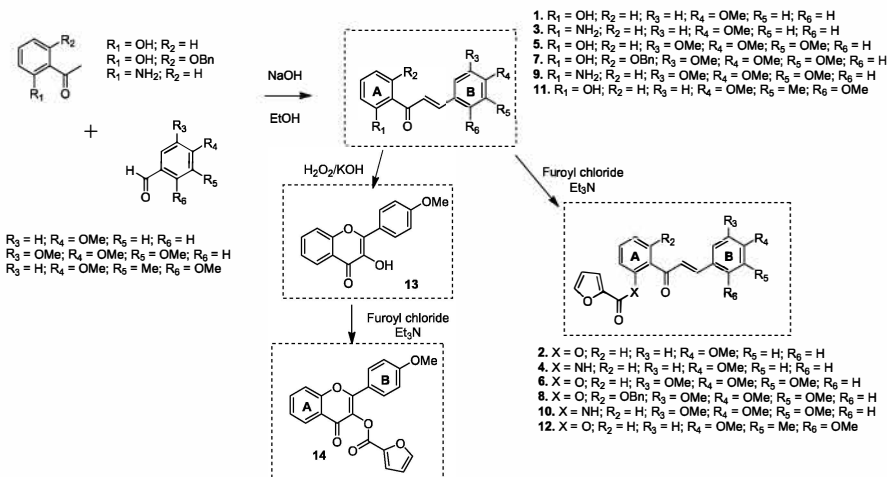
Chalcone 1, the first compound of this series, a 4-methoxy substituted chalcone exhibited low cytotoxicity against the human tumor cells assayed. However, the introduction of a furyl radical as an ester at 2' position on the A ring in the chalcone skeleton enhanced the cytotoxicity approximately 200-fold in U-937 cells (IC₅₀ = 0.2 ± 0.1 μM vs. IC₅₀ = 44.9 ± 4.4 μM for chalcone 2 and chalcone 1, respectively). This increase in cytotoxic activity was also observed in the other cell lines assayed. Cytotoxicity increased ~ 100-fold, 40-fold, 3-fold and 14-fold in HL-60, MOLT-3, SK-MEL-1 and MEL-HO, respectively. The substitution of the hydroxyl at 2' position of the A ring of chalcone 1 for an amino group to generate chalcone 3 increased ~ 4-fold the cytotoxicity against U-937 and ~ 3-fold against HL-60 and MOLT-3 cells. However, this enhancement in cytotoxicity was not observed in MEL-HO melanoma cells.

The amidation of the amino group with furyl chloride to afford chalcone 4 resulted in an amplification of cytotoxicity. The IC₅₀ values were ~ 1 μM in leukaemia cells and also in SK-MEL-1. This structural modification displayed distinct cytotoxicity against melanoma cells. The amide chalcone 4 was almost 10-fold more cytotoxic than the corresponding ester 2 against SK-MEL-1 cells but not against MEL-HO cells.

The insertion of two additional methoxy groups in chalcone 1 setting up a 3,4,5-trimethoxy system on the B ring to furnish chalcone 5 did not affect the cytotoxicity against the leukaemia cells assayed, showing similar IC₅₀ values. In contrast, this modification blocked totally the cytotoxicity against melanoma cells.

The introduction of a furyl ester in chalcone 5 to generate chalcone 6 increased slightly the cytotoxicity in all cell lines assayed, except for MOLT-3 cells in which the IC₅₀ values for 5 and 6 were similar. However, chalcone 6 was much less potent than chalcone 2. In comparison to chalcone 2, the results suggest that the insertion of two additional electron-donating methoxy groups at positions 3 and 5 on the B ring, led to an important reduction in the antiproliferative activity against leukaemia and melanoma cells. The presence of a benzoyloxy group in 6' position on the A ring of chalcone 5 to generate chalcone 7 increased the cytotoxicity against U-937 and HL-60 cells by approximately 10-fold, with ~ 4-fold and ~ 6-fold increases against MOLT-3 and melanoma cells, respectively. However, the introduction of a furyl radical in chalcone 7 to generate chalcone 8 did not enhance the cytotoxicity, except for MEL-HO which increased 2-fold with respect to its precursor.

In the case of the 3,4,5-trimethoxychalcones, the substitution of the 2'-hydroxy in the ring A of compound 5 for an amino group, to generate amino-chalcone 9, increased approximately 7-fold the cytotoxicity against U-937, HL-60 and MEL-HO cells. However, the introduction of a furyl radical in the amino group (compound 10) had different effects depending on the cell line. The IC₅₀ values were similar for 9 and 10 in U-937 cells and there was a decrease in cytotoxicity against HL-60,



Scheme 1. Synthesis of chalcones and flavonols.

MOLT-3 and melanoma cells.

Table 1 also provides important information regarding the presence of the furoyl radical on the A ring in the chalcone 11 containing a 2,4-dimethoxy-3-methyl substitution pattern on the B ring. Although compound 11 did not display cytotoxicity against cancer cells ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), the esterification of the hydroxy group at 2' position of the A ring with 2-furoyl chloride led to an increase in cytotoxicity in the three leukaemia cells assayed (IC_{50} values of $7.1 \pm 0.6 \mu\text{M}$, $7.8 \pm 1.8 \mu\text{M}$ and $5.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$ for compound 12 in U-937, HL-60 and MOLT-3, respectively). However, this modification did not affect the cytotoxicity against SK-MEL-1 and MEL-HO melanoma cells.

The effect of the cyclization of chalcone 1 to yield the flavonol 13 and its furoyl ester derivative 14 on cytotoxicity was also explored. In general, a great reduction in the cytotoxicity was observed except for compound 14 in leukaemia cells (Table 1). The SAR of chalcones derivatives are displayed graphically in Fig. 1. The most relevant results are that the cytotoxicity improved by (i) the presence of a furoyl radical as an ester or an amide, (ii) the substitution of the 2-hydroxyl for an amino group at least against human leukaemia cells, and (iii) the presence of a benzyloxy group. However, cyclization led to a major reduction in cytotoxicity.

These results suggest that the main determinant of cytotoxicity in 4-methoxy-chalcone is the presence of a furoyl radical on the A ring, and that one of the most cytotoxic compounds was the chalcone 2 in all cell lines assayed (Table 1). In these experiments, the antineoplastic agent etoposide was included as a positive control for U-937 ($\text{IC}_{50} = 1.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$), HL-60 ($\text{IC}_{50} = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$) and MOLT-3 ($\text{IC}_{50} = 0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$).

Since the furoloxychalcone 2 (FMC) was found to be one of the most cytotoxic compounds, it was selected for further experiments using the human histiocytic lymphoma U-937 and the human myeloid leukaemia HL-60 cells as models. In accordance with the concentration-dependent inhibition of viability, FMC induced significant morphological changes and caused an important decrease in the number of cells, as visualized by phase-contrast microscopy (Fig. 2a and b). When U-937 and HL-60 cells were treated with FMC ($0.3 \mu\text{M}$) for 12 days the colony formation was almost completely inhibited as well as the volume of the colonies, in a similar way to the antitumor etoposide ($0.2 \mu\text{M}$) which was used as a positive control (Fig. 2c). Human quiescent peripheral blood

mononuclear cells obtained from healthy donors were more resistant to the effects on viability of FMC than U-937 and HL-60 cells. Although proliferating lymphocytes were more sensitive than quiescent mononuclear cells they were also slightly more resistant than leukaemia cells. In addition, the fibroblast-like Vero cells showed less cytotoxicity even at $10 \mu\text{M}$ FMC for 24 h. These results indicate that FMC inhibits the viability of leukaemia cells while normal quiescent lymphocytes showed no appreciable toxicity up to $10 \mu\text{M}$ of chalcone for 24 h (Fig. 2d).

2.2.2. Furoloxychalcone induced $G_2\text{-M}$ arrest and apoptosis in human myeloid leukaemia cells

To investigate whether the decrease in viability induced by FMC was caused by changes in cell cycle phases, flow cytometric analyses were included in this study. To this end, U-937 and HL-60 cells were incubated with increasing concentrations of FMC for different periods of time (6–24 h), stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. As shown in Table 2 and Fig. 3a, a concentration as low as $1 \mu\text{M}$ was able to induce a $G_2\text{-M}$ arrest after 6 h of treatment in both cell lines. The percentage of U-937 control cells in $G_2\text{-M}$ phase was approximately 20%, which increased to 31%, 38% and 35% after treatment with $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ and $10 \mu\text{M}$ FMC, respectively, and this was accompanied by a reduction in cells in the G_1 phase. The increase in $G_2\text{-M}$ phase cell population was also observed at 12 h of treatment and this effect started diminishing at 24 h. In U-937 cells, the percentage of sub- G_1 (i.e., apoptotic cells) increased until 14.3% (–4-fold), 20.2% (10-fold) and 53.3% (23-fold) by $3 \mu\text{M}$ FMC after 6, 12 and 24 h of treatment, respectively. Similar results were obtained in HL-60 cells. The percentage of HL-60 cells in $G_2\text{-M}$ was ~20% which increased to 33% and 43% after 6 h and 12 h of treatment with $3 \mu\text{M}$ FMC, respectively. This $G_2\text{-M}$ arrest decreased after 24 h of treatment and was associated with a fifty-fold increase in the percentage of sub- G_1 cells (1.1% vs. 54.8%). Representative histograms of flow cytometry after propidium iodide labeling are shown in Fig. 3a. Since FMC caused $G_2\text{-M}$ phase arrest, whether this chalcone might affect tubulin polymerization was investigated using an *in vitro* assay and monitoring the increase in absorbance of the reaction mixture. The results demonstrated that FMC inhibited tubulin polymerization in a concentration-dependent manner. In these experiments colchicine ($5 \mu\text{M}$) and taxol ($10 \mu\text{M}$) were used as positive controls of inhibition and promotion of tubulin polymerization,

Table 1
Effects on cell viability of propenone derivatives on human tumour cells.

Compound	IC ₅₀ (μM)				
	U-937	HL-60	MOLT-3	SK-MEL-1	MEL-HO
1	44.9 ± 4.4	35.2 ± 7.5	23.5 ± 9.9	40.7 ± 10.2	26.8 ± 2.1
2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	12.5 ± 1.5	2.0 ± 0.1
3	10.9 ± 2.4	12.4 ± 2.2	7.4 ± 1.1	28.2 ± 4.8	34.2 ± 7.9
4	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.6	11.8 ± 3.8
5	38.7 ± 8.5	46.6 ± 9.8	12.6 ± 5.8	>100	71.1 ± 19.2
6	21.7 ± 12.3	23.1 ± 7.5	11.8 ± 6.7	30.3 ± 7.9	28.2 ± 2.7
7	4.1 ± 1.6	5.8 ± 2.2	3.6 ± 0.8	19.3 ± 2.4	11.9 ± 3.4
8	5.0 ± 1.6	3.6 ± 1.3	2.8 ± 0.5	17.8 ± 0.4	6.2 ± 1.6
9	5.9 ± 1.5	6.3 ± 0.9	6.4 ± 3.0	31.2 ± 3.1	11.6 ± 2.2
10	4.2 ± 1.5	26.1 ± 4.9	23.1 ± 8.6	>100	>100
11	>100	>100	>100	>100	>100
12	7.1 ± 0.6	7.8 ± 1.8	5.8 ± 1.2	>100	>100
13	79.7 ± 21.6	55.9 ± 12.9	45.3 ± 10.2	>100	>100
14	50.4 ± 7.7	33.1 ± 12.4	5.6 ± 2.9	>100	58.3 ± 26.6

Cells were incubated with increasing concentrations of the indicated compounds for 72 h and the IC₅₀ values were determined as described in the Material and methods Section. Data are expressed as means ± SEM from the dose–response curves of 3–5 independent experiments with three determinations in each.

respectively (Fig. 3b). The IC₅₀ value for inhibition of tubulin polymerization (defined as the compound concentration that inhibited the extent of assembly by 50% after 20 min incubation at 37 °C) was 4.9 ± 1.3 μM (mean ± S.E.; n = 3). To prove that FMC interferes with the microtubule network we performed immunofluorescence techniques using a monoclonal α-tubulin antibody. As shown in Fig. 3c, visualized by fluorescence microscopy, FMC treatment disrupted the tubulin network in a similar way to colchicine (0.1 μM). As expected, taxol (0.2 μM) enhanced microtubule polymerization with an increase in the density of cellular microtubules. These results indicate that FMC inhibited the polymerization of microtubules in leukaemia cells.

To explore whether the molecular mechanism of FMC-induced G₂-M cell cycle arrest in leukaemia cells involves up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Cip1/WAF1}, time-course and dose–response experiments were performed and p21^{Cip1/WAF1} levels were determined by Western blot. As shown in Fig. 4a, FMC caused a time- and concentration-dependent up-regulation of p21^{Cip1/WAF1} in both cell lines. The quantification of apoptosis obtained by measurement of the number of sub-G₁ cells by flow cytometry reveals that maximum levels of apoptosis induction were obtained after treatment with 3 μM FMC for

24 h in both cell lines (Table 2, Fig. 4b).

The nuclei of treated cells (3 μM FMC, 24 h) visualized by fluorescence microscopy after Hoechst 33,258 staining revealed condensation and fragmentation of chromatin (Fig. 4c). In addition, the percentage of apoptotic cells, determined by the flow cytometric evaluation of the number of annexin V-FITC positive cells (Fig. 4d), increased fifteen times in U-937 cells treated with 3 μM FMC for 24 h, and 4-fold in HL-60 cells (Fig. 4e). These results indicate that FMC induces G₂-M phase arrest and apoptosis in human myeloid leukaemia U-937 and HL-60 cells.

2.2.3. Furoxyloxychalcone induced caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage

To explore whether the mechanism of cell death triggered by FMC in human leukaemia cells was associated with caspase activation, the enzymatic activity of cell lysates on specific tetrapeptide substrates was analyzed after treatment with 3 μM FMC for different time periods. As shown in Fig. 5a, maximal caspase-3/7, -8 and -9 activities were obtained after 24 h of treatment with FMC in U-937 and HL-60 cells. To determine whether the chalcone induced cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), which is considered a hallmark of apoptosis and

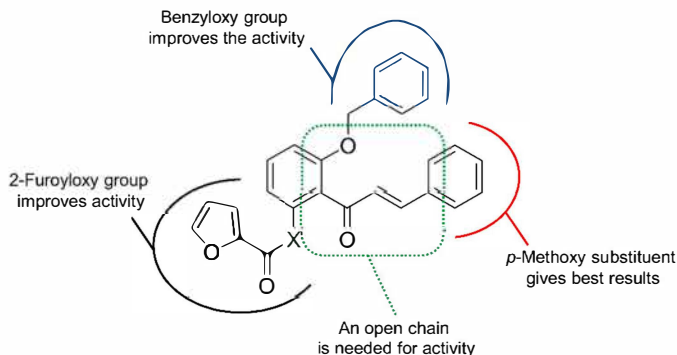


Fig. 1. Structure-activity relationship of chalcone analogues.

that indicates activation of caspase, nuclear fractions of treated cells were analyzed by immunoblotting. As shown, the 85 kDa fragment generated from the full-length PARP protein was detected in FMC-treated cells after 6 h exposure at a concentration as low as 1 μM and increased in a concentration- and time-dependent manner (Fig. 5b). Processing of caspases in cells treated with FMC were analyzed by immunoblotting to define the temporal relationship of caspase activation and PARP cleavage. Executioner caspases-3 and -7 were processed and detected by the generation of a fragment and a decrease of the proenzyme, respectively. The decrease of procaspase-7 was more evident in U-937 than in HL-60. Caspase-4 which is involved in inflammation was also examined and it was detected a decrease of the proenzyme after treatment with 3 μM FMC in both cell lines. The initiator caspases were also processed and procaspase-9 processing was earlier than procaspase-8. The processing of caspase-9, detected as a decrease on the proenzyme, was observed at 6 h, whereas the decrease in the proenzymes procaspase-8 and -7 was detected after 12 h of treatment, at least in U-937 cells when PARP cleavage was more apparent. The levels of procaspase-9 processing peaked at 6 h, whereas the levels of cleaved caspase-3 peaked at 24 h. These cleavage patterns suggest that the initial PARP cleavage before caspase-3 cleavage might be attributable to caspase-9/caspase-7 cleavage, and then caspase-3 activation could amplify the hydrolysis of PARP.

To determine whether cell death triggered by FMC is blocked by a pan-caspase inhibitor, U-937 cells were pretreated with z-VAD-fmk (100 μM) and then with the chalcone for 24 h and analyzed by flow cytometry after double staining with annexin V-FITC and propidium iodide. Results revealed that the general inhibitor decreased the percentage of annexin V-FITC positive cells as well as the percentage of propidium iodide positive cells (Fig. 5c). As shown in Fig. 5d, the percentage of annexin V-FITC plus propidium iodide positive cells was $4.3 \pm 0.3\%$ in control cells, which increased until $50.0 \pm 5.0\%$ after treatment with FMC or until $22.4 \pm 7.3\%$ in the combination group (z-VAD-fmk + FMC).

2.2.4. Furoxyloxychalcone induced cytochrome c release but did not decrease the mitochondrial membrane potential

Activation of caspase-9 is dependent on the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol. To determine whether FMC-induced cell death involves cytochrome c release, dose-response and time-course experiments were performed and cytosolic fractions were analyzed by immunoblotting. As shown in Fig. 6a, an increase in cytochrome c in the cytosol was detected starting at 6 h of treatment with a low concentration of FMC (1 μM) in both cell lines, U-937 and HL-60. To investigate whether a disruption of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) is

required for cytochrome c release, cells were treated with vehicle (DMSO) or increasing concentrations of FMC for 6 h, stained with the fluorochrome JC-1 and analyzed by flow cytometry. The results showed that $\Delta\Psi\text{m}$ remained intact for at least 6 h of treatment, suggesting that the dissipation of the mitochondrial membrane potential was not implicated in FMC-induced cell death (Fig. 6b).

2.2.5. Overexpression of Bcl-2 confers protection against apoptosis induced by the furoxyloxychalcone

To confirm the key role of the intrinsic pathway in the mechanism of FMC-induced cell death, we compared the effect on apoptosis induction in U-937 cells over-expressing Bcl-2 (U-937/Bcl-2) and the parental U-937 cells. As shown in Fig. 7a, dose-response experiments revealed that the over-expression of Bcl-2 almost completely suppressed the increase in the percentage of sub-G₁ cells after 24 h of treatment. U-937/Bcl-2 cells were, however, sensitive to cell cycle arrest at G₂-M phase induced by FMC (Fig. 7b). The effect of FMC on cell viability was also evaluated in both cell lines and as expected, the reduction in the number of cells was higher in U-937 than in U-937/Bcl-2 (Fig. 7c). The decrease in the number of cells with respect to control in U-937/Bcl-2 may be a consequence of the G₂-M cell cycle arrest since in these conditions the percentage of viable cells was 96%. The cytotoxic agent ara-C (1- β -D-arabinofuranosylcytosine) which induces cell death through the mitochondrial pathway triggered a higher decrease in the number of cells in U-937 cells than in U-937/Bcl-2. The morphological changes and the decrease in the number of cells by FMC were clearly visualized by phase-contrast microscopy (Fig. 7d).

2.2.6. Furoxyloxychalcone induced downregulation of Bcl-xL and Mcl-1 and up-regulation of DR5

To determine whether the inhibition of viability triggered by FMC was associated with changes in the expression of the Bcl-2 family proteins, cells were incubated with increasing concentrations of chalcone in time course experiments and whole cell lysates (or the cytosolic fraction in the case of Bax) were analyzed by immunoblotting. As shown in Fig. 8, downregulation of Bcl-xL, Mcl-1 and cytosolic Bax was detected after 24 h of treatment with FMC. Although changes in the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 were not observed, the levels of the pro-apoptotic Bak increased at 6 h of treatment at least in U-937 cells, while the pro-apoptotic members Bid and Bim decreased. In addition, the expression of TRAIL (Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand) and death receptors which are involved in the extrinsic pathway of cell death were also explored. As shown in Fig. 8, FMC failed to affect the expression levels of TRAIL, and appeared to decrease the levels of DR4 at least in U-937 cells. Interestingly, FMC increased the amounts of

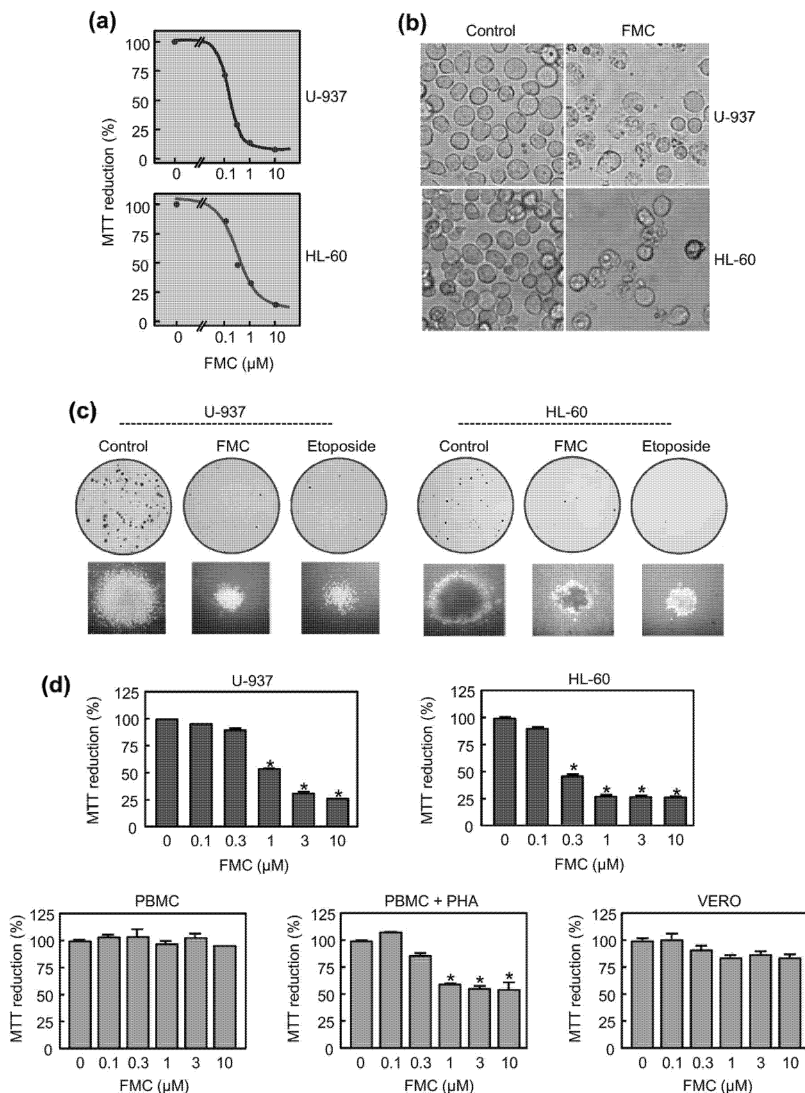


Fig. 2. FMC inhibited viability of human U-937 and HL-60 cells. (a) Cells were cultured with increasing concentrations of FMC for 72 h and mitochondrial respiratory function was determined by the MTT assay. (b) Cells were treated with 3 μM FMC for 24 h and images were obtained with an inverted phase-contrast microscope; original magnification 20x. (c) Soft agar colony formation assay. Cells were plated in a soft agar colony formation assay with vehicle (DMSO), 0.3 μM FMC or 0.2 μM etoposide for twelve days and the colony formation ability was analyzed. Representative plates and colonies visualized by phase-contrast microscopy are shown. Picture of wells are representative of three independent experiments. (d) Differential effect of FMC on cell viability of human U-937 and HL-60 leukaemia cells vs. normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC), phytohemagglutinin (PHA)-activated healthy human PBMC and Vero. Cells were cultured in the presence of the indicated concentrations of FMC for 24 h and mitochondrial respiratory function was determined by the MTT assay. Values represent means ± S.E. of three independent experiments each performed in triplicate. * $P < 0.05$, significantly different from the untreated control.

Table 2
Effects of FMC on cell cycle phase distribution of human leukaemia cells.

		FMC (μM)	%Sub-G ₁	%G ₁	%S	%G ₂ -M
U-937	6 h	0	3.8 \pm 1.1	51.9 \pm 1.6	24.2 \pm 2.1	19.9 \pm 0.7
		1	15.7 \pm 0.3	26.0 \pm 0.8*	26.6 \pm 0.3	31.2 \pm 0.3*
		3	14.3 \pm 0.9*	19.0 \pm 1.5*	27.7 \pm 0.6	38.2 \pm 2.5*
		10	13.6 \pm 1.1*	20.6 \pm 0.6*	29.4 \pm 0.3*	35.4 \pm 0.8*
	12 h	0	2.1 \pm 0.4	48.5 \pm 1.1	25.1 \pm 0.7	22.2 \pm 0.6
		1	18.8 \pm 0.3*	12.4 \pm 2.5*	22.5 \pm 0.9	43.4 \pm 1.7*
		3	20.2 \pm 1.6*	7.7 \pm 0.7*	24.7 \pm 1.2	44.4 \pm 1.1*
		10	17.2 \pm 0.1*	10.2 \pm 0.4*	26.6 \pm 0.5	43.0 \pm 0.4*
	24 h	0	2.3 \pm 0.4	53.1 \pm 1.6	23.8 \pm 0.6	19.2 \pm 1.1
		1	11.3 \pm 2.7*	36.1 \pm 2.2*	28.4 \pm 0.3*	20.2 \pm 0.6
		3	53.3 \pm 5.1*	22.1 \pm 2.0*	14.0 \pm 2.1*	6.7 \pm 1.6*
		10	58.2 \pm 3.3*	15.5 \pm 1.6*	12.8 \pm 1.9*	10.7 \pm 0.6*
HL-60	6 h	0	2.9 \pm 0.7	44.3 \pm 0.0	31.2 \pm 0.2	21.5 \pm 0.4
		1	7.1 \pm 0.9	24.3 \pm 0.1*	35.3 \pm 0.2	33.0 \pm 0.8*
		3	7.2 \pm 1.4*	22.4 \pm 0.5*	36.3 \pm 1.8	33.9 \pm 0.0*
		10	6.3 \pm 0.4*	24.3 \pm 2.3*	35.6 \pm 0.6	33.4 \pm 2.0*
	12 h	0	2.6 \pm 0.2	48.3 \pm 0.5	29.3 \pm 0.5	19.2 \pm 0.4
		1	11.2 \pm 1.5	18.6 \pm 2.8	31.6 \pm 0.9	37.4 \pm 0.7*
		3	13.2 \pm 1.0*	8.5 \pm 0.4*	33.5 \pm 1.6*	43.8 \pm 0.2*
		10	11.6 \pm 3.0*	9.9 \pm 0.4*	32.6 \pm 0.2*	45.1 \pm 3.6*
	24 h	0	1.1 \pm 0.2	52.7 \pm 0.2	30.2 \pm 0.7	15.7 \pm 0.7
		1	16.6 \pm 3.3*	50.7 \pm 1.3	21.5 \pm 1.1*	10.8 \pm 0.9
		3	54.8 \pm 0.9*	17.8 \pm 2.1*	10.2 \pm 0.8*	16.4 \pm 2.0
		10	59.4 \pm 1.6*	14.7 \pm 0.1*	9.3 \pm 0.1*	15.9 \pm 1.6

Cells were incubated with the specified concentrations of FMC for increasing times and the cell cycle phase distribution was determined by flow cytometry. The values are means \pm S.E. of two independent experiments with three determinations in each. Asterisks indicate a significant difference ($P < 0.05$) compared with the corresponding controls.

DR5 in both cell lines.

2.2.7. Furoxyloxychalcone increased reactive oxygen species generation and cell death was blocked by catalase and associated with MAPK pathway activation.

An increase in reactive oxygen species (ROS) may induce death in leukaemia cells [21]. To explore whether FMC induces ROS in U-937 and HL-60, cells were treated with the chalcone, stained with the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF) and analyzed by flow cytometry. An increase in DCF fluorescence was detected in FMC-treated cells as detected by a rightward shift in fluorescence (Fig. 9a). To investigate whether oxidative stress triggered by FMC is essential for FMC-mediated cell death, cells were pre-treated with catalase (500 units/mL), one of the most important antioxidants which has a crucial role in the degradation of H₂O₂. As shown, this enzyme was able to block in great part the increase in the percentage of sub-G₁ cells and the generation of ROS (Fig. 9b and 9c). In addition, catalase was found to at least partially block the reduction in the number of cells triggered by FMC (Fig. 9d).

Since the increase in ROS generation in leukemic cells lead to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade [21–24], the possibility that FMC was able to activate this pathway was also investigated. As shown (Fig. 9e), this chalcone lead to phosphorylation of c-jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases (JNK/SAPK) and p38^{MAPK} in U-937 and HL-60 cells, while phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) was only observed in U-937 cells.

3. Discussion

Few examples of chalcones containing the furoxyloxy radical have been described to exhibit antiproliferative activity against cancer cell lines and display low cytotoxicity against normal cells [25]. In addition, chalcones containing specific aromatic rings have been tested as ABCG2 (ATP binding cassette G2) inhibitors [26]. In contrast, methoxy-flavonoids have been described to be more potent inhibitors of cancer cell proliferation than their corresponding nonmethoxylated analogs

[27]. The presence of methoxy groups or some lipophilic moieties in specific flavonoids confers hydrophobicity and significantly increases the potency and bioavailability and also enhances the stability and effectiveness by preventing chemical and metabolic hydrolysis [28–31].

In the present study, we attempted to find new potent antiproliferative molecules inspired by natural products. Specifically, we synthesized twelve chalcones and two cyclic compounds and evaluated the potential cytotoxicity against human tumour cells. The introduction of a furoyl heterocycle as an ester or an amide improved or maintained the cytotoxicity in most tumor cell lines and, in some cases, the observed increase in activity was highly significantly (compounds 2 and 4). Interestingly, the unavailability of intramolecular hydrogen bonding between the OH and the ketone group lead to an increase in cytotoxicity. This suggests that the ketone group would be free to interact with a specific binding site. This fact opens new avenues of research to unravel the mechanism of action.

The results revealed that a specific 4-methoxychalcone containing a furoxyloxy radical at 2' position on the A ring (FMC) was the most cytotoxic compound, with IC₅₀ values of 0.2 \pm 0.1 μM , 0.3 \pm 0.1 μM and 0.6 \pm 0.1 μM against U-937, HL-60 and MOLT-3 cells, respectively. Interestingly, the melanoma cell line MEL-HO was also sensitive to the antiproliferative effects of this chalcone. To our knowledge this is the first time to date that the reduction of viability and the mechanism involved in cancer cells death of this specific chalcone has been described.

The human leukaemia U-937 and HL-60 cells were more sensitive to FMC than quiescent PBMC and the fibroblast-like Vero cells, as determined by the MTT assay. This chalcone was able to induce a fast G₂-M phase cell cycle arrest, starting at 6 h, and followed by an increase in the percentage of sub-G₁ cells. The G₂-M arrest triggered by FMC might be explained by an inhibition of tubulin polymerization or by changes in the expression and/or activity of G₂-M cell cycle regulators. Tubulin is widely recognized as an attractive molecular target for potential anti-cancer agents. Some flavonoids display their antiproliferative activity by targeting microtubules through tubulin binding [32] and we have previously reported that some naturally occurring and synthetic flavonoids block tubulin polymerization [33–35]. Here we found that FMC

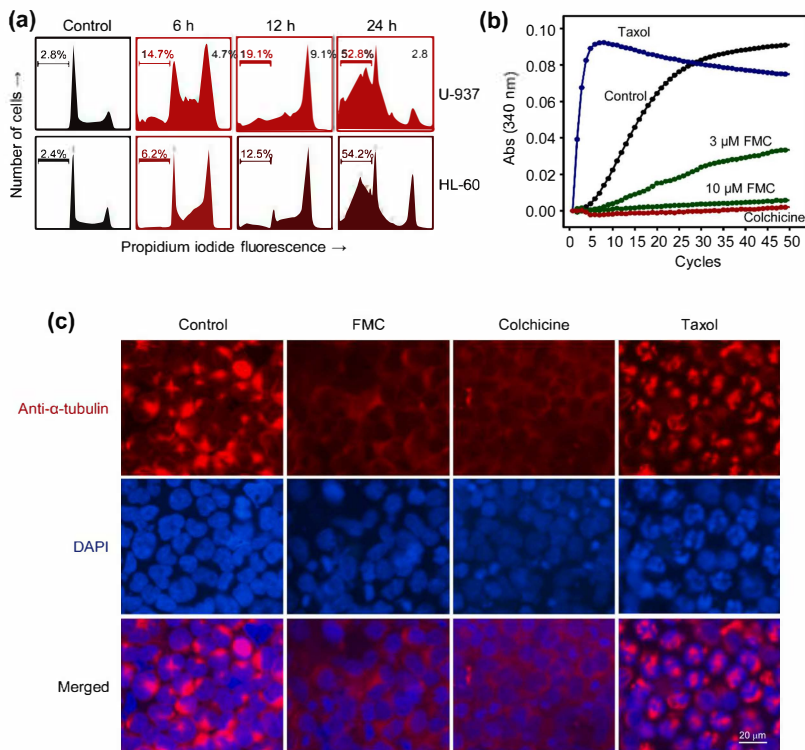


Fig. 3. FMC induced cell cycle changes and inhibited the polymerization of microtubules. (a) Cells were cultured with 3 μM FMC for increasing periods of time, stained with propidium iodide and subjected to flow cytometry. Sub-G₁ cells (apoptotic cells) are shown in region marked with a bar. (b) FMC inhibited tubulin polymerization. Purified bovine brain tubulin was incubated at 37 °C in the absence (control) or in the presence of colchicine (5 μM), taxol (10 μM) or the specified concentrations of FMC and the absorbance at 340 nm was measured in a microplate reader. (c) Effect of FMC on the organization of cellular microtubule network. HL-60 cells were incubated with 3 μM FMC for 12 h, harvested and fixed. Cells were then incubated with a monoclonal anti- α -tubulin antibody and after with an Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody. The cellular network of microtubules was analyzed using a Nikon fluorescent microscope. Colchicine (0.1 μM) and taxol (0.2 μM) were used as microtubule-depolymerization and -polymerization positive controls, respectively. Nuclear staining was performed with 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Original magnification: 40x.

inhibited tubulin polymerization in a concentration-dependent manner. This result revealed that FMC may target tubulin to exhibit cytotoxicity. Interestingly, this chalcone was able to induce the cyclin-dependent kinases (Cdk) inhibitor p21^{Cip1/WAF1}, suggesting a relationship between the G₂-M arrest and cell death induction. Future studies will be needed to determine the effect of FMC on additional G₂-M cell cycle regulators such as Cdk1, B-type cyclin isoforms and Cdc25C phosphatase.

The synthetic chalcone induced the activation and processing of initiator and executioner caspases in U-937 and HL-60 cells. The temporal relationship between caspase activation and PARP cleavage suggests that the initial PARP hydrolysis might be due to caspase-9/caspase-7 cleavage, followed by caspase-3 activation which could amplify the processing of PARP. Cell death induced by FMC was dependent on caspases since the general inhibitor of caspases, z-VAD-fmk, was able to significantly decrease the percentage of annexin V-FITC positive cells at least in U-937 cells. The furoxyloxychalcone FMC induced an early release of cytochrome *c* (6 h) and this was not accompanied by

dissipation of the mitochondrial transmembrane potential. Our results are in accordance with previous studies on cell lines indicating that mitochondrial events associated with changes in $\Delta\Psi_m$ are not required for the complete release of cytochrome *c* upon mitochondrial outer membrane permeabilization [36]. Apoptosis without complete mitochondrial potential dissipation has also been reported to occur in CEM cells [37]. The absence of a parallel decrease in $\Delta\Psi_m$ and the cytochrome *c* release observed in HL-60 and U-937 cells might be explained by the possibility that not all mitochondrial cytochrome *c* actively participates in the electron transport chain, as previously suggested by Bossy-Wetzel et al. [37]. Whether FMC promotes mitochondrial $\Delta\Psi_m$ dissipation, particularly at longer times of treatment, cannot be ruled out.

Overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 blocked the cell death triggered by FMC which suggests that Bcl-2 itself might be a potential target in the mechanism of cell death. Although FMC failed to down-regulate the Bcl-2 protein, the furoxyloxychalcone downregulated the levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1 after 24 h of treatment. Furthermore, cytosolic levels of Bax were decreased

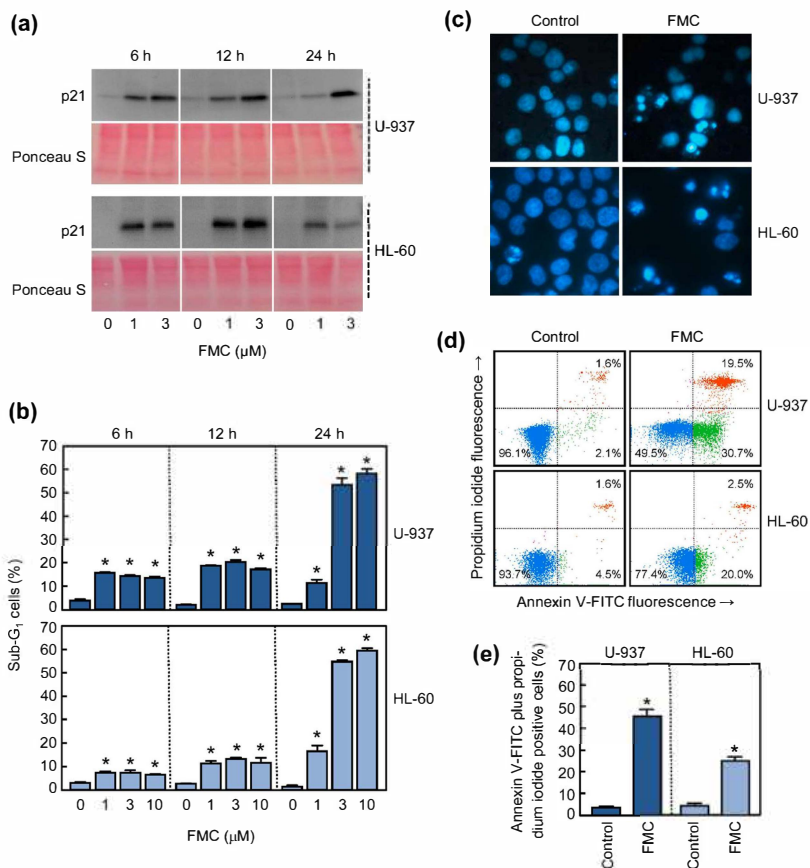


Fig. 4. FMC induced apoptosis in human U-937 and HL-60 cells. (a) Cells were cultured with the indicated concentrations of FMC for the specified times and nuclear lysates were assayed by immunoblotting. Ponceau S staining was used as a transfer and loading control. A representative section is shown. (b) Cells were treated as indicated in (a) and apoptosis was quantified as percentage of sub-G₁ cells by flow cytometry. Values represent means \pm SEs of two independent experiments each performed in triplicate. * $P < 0.05$, significantly different from the untreated control. (c) Photomicrographs of representative fields of cells treated with 3 μ M FMC for 24 h and stained with Hoechst 33258. (d) Cells were treated as in (c), double stained with Annexin V-FITC and propidium iodide and subjected to flow cytometric analysis. (e) Cells were treated as in (d) and quantified by flow cytometry. Bars represent means \pm SEs of three independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$, significantly different from the untreated control.

suggesting a translocation of Bax to mitochondrial outer membrane in accordance upon apoptosis induction. The immunoblot experiments revealed a downregulation of Bid which might be caused by truncation of the full-length Bid by caspase-8 activation and processing. The activation of this initiator caspase is mediated by ligand-binding to death receptors and activation of the death-domain-containing tumor necrosis factor receptor superfamily. The results revealed that FMC is a DR5 inducer and may have potential clinical importance, however further research is needed to determine whether this chalcone is able to amplify the sensitivity to TRAIL.

The generation of ROS causes oxidative stress and cell death [38]. In this paper, we demonstrated that FMC increased the levels of ROS in U-937 and HL-60 cells. Although we have not identified the primary source

of ROS, we demonstrated that ROS generation was an early event since it was detected after 3 h of treatment with FMC. In contrast, the release of cytochrome *c* in the cytosol of U-937 and HL-60 cells at 3 h of treatment. Thus, ROS generation appears not to be a consequence of cytochrome *c* release. Interestingly, the generation of ROS as well as the increase in the percentage of sub-G₁ cells was reversed by the antioxidant enzyme catalase suggesting that the oxidative stress triggered by FMC is involved in the mechanism of cell death. Furthermore, FMC was able to activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway which is involved in cell proliferation, survival and death [39]. Specifically, FMC induced the phosphorylation and activation of the

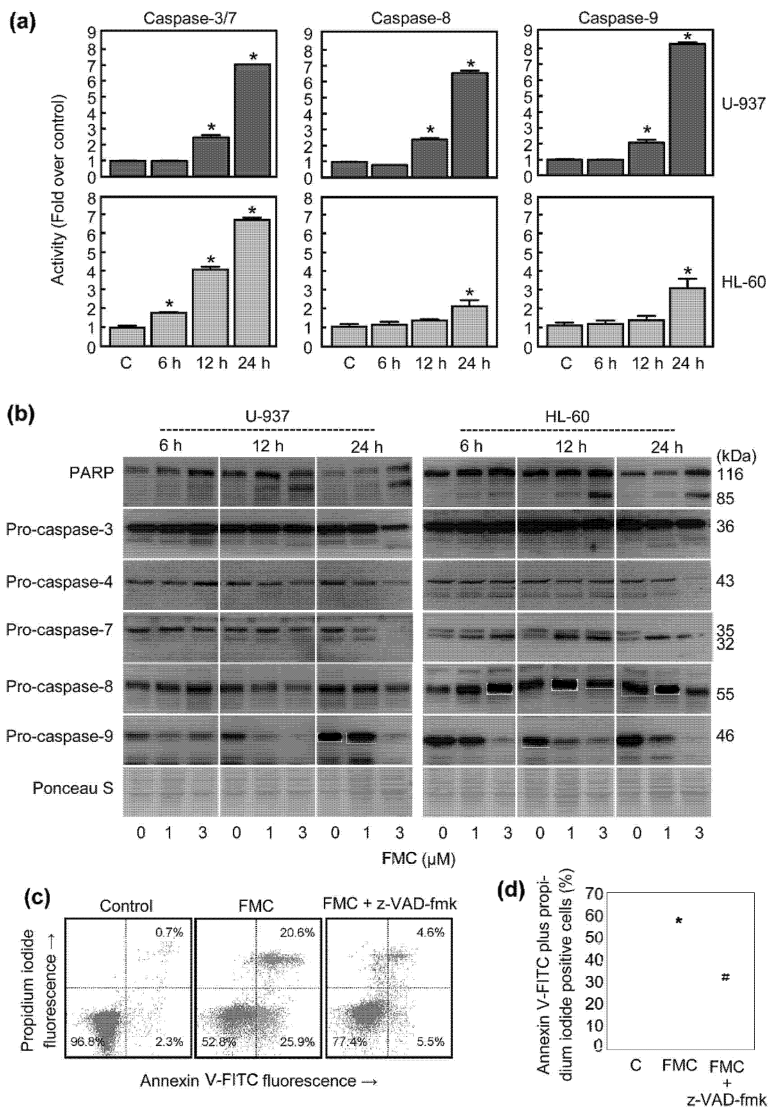


Fig. 5. FMC induced caspase activation in human U-937 and HL-60 cells. (a) Time-course of caspase substrate hydrolysis activities. Cells were treated with 3 μM FMC, harvested at indicated times and total cell lysates were assayed for caspase activity using the chromogenic substrates DEVD-pNA (for caspase-3/7), IETD-pNA (for caspase-8), and LEHD-pNA (for caspase-9). Results are expressed as fold increase in enzyme activity compared with control. Values represent means \pm SEs of two independent experiments performed in triplicate. (b) Time course of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and procaspases processing. Cells were incubated with the indicated times and concentrations of FMC and proteins were detected by western blot. Ponceau S was used as a loading and transfer control. (c) U-937 cells were treated with FMC (3 μM , 24 h) in the absence or the presence of z-VAD-fmk (100 μM) and subjected to flow cytometry after double staining with annexin V-FITC and propidium iodide. (d) U-937 cells were treated as in (c) and quantified by flow cytometry. Bars represent means \pm SE of two independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ from untreated control. # $P < 0.05$ significantly different from FMC treatment.

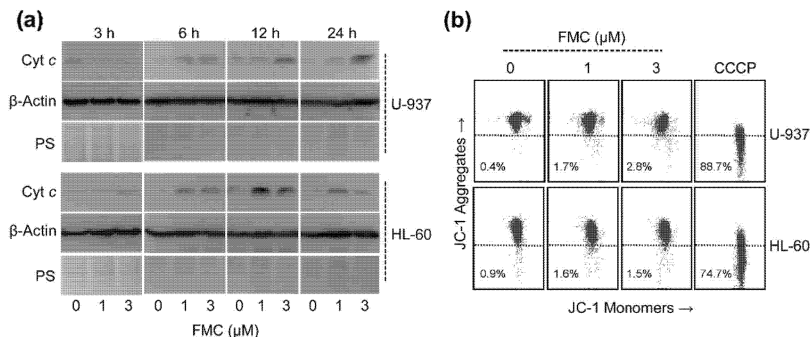


Fig. 6. FMC induced cytochrome c release and did not reduce the mitochondrial membrane potential. (a) Representative immunoblots show the time- and concentration-dependent cytochrome c release by FMC. Cells were cultured with the specified concentrations of FMC for the indicated time points and cytosolic fractions were obtained and analyzed on Western blots with specific antibodies against cytochrome c and β -actin, which was used as a loading control. Equal protein loading was also controlled by staining the membrane with Ponceau S (PS) before the immunodetection. (b) Cells were incubated with the indicated concentrations of FMC for 6 h, stained with the JC-1 probe and $\Delta\Psi_m$ was analyzed by flow cytometry. Similar results were obtained in two independent experiments each performed in triplicate. The protonophore CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, 50 μ M) was used as a positive control.

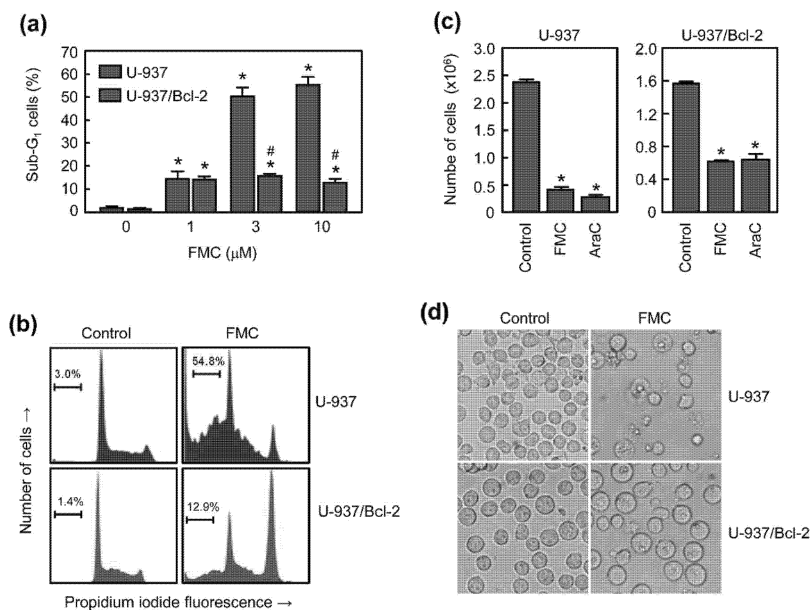


Fig. 7. Over-expression of Bcl-2 blocked FMC-induced apoptosis. (a) Cells were cultured with the specified concentrations of FMC for 24 h and cell cycle analyzed by flow cytometry. (b) Representative histograms and the percentage of sub-G₁ cells (apoptotic cells) after treatment with 3 μ M for 24 h are shown. (c) Differential effects on cell numbers after treatment with 3 μ M FMC for 24 h. Ara-C (1- β -D-arabinofuranosylcytosine, 1 μ M, 24 h) was included as a positive control. (d) Photomicrographs obtained with an inverted phase-contrast microscope after treatment with 3 μ M FMC for 24 h. * P < 0.05 from untreated control. # P < 0.05 significantly different from FMC treatment.

JNK/SAPK and p38^{MAPK} in both cell lines. Future experiments will be necessary to determine the role of these protein kinases in the mechanism of cell death.

4. Conclusions

In summary, we designed and synthesized a series of chalcones

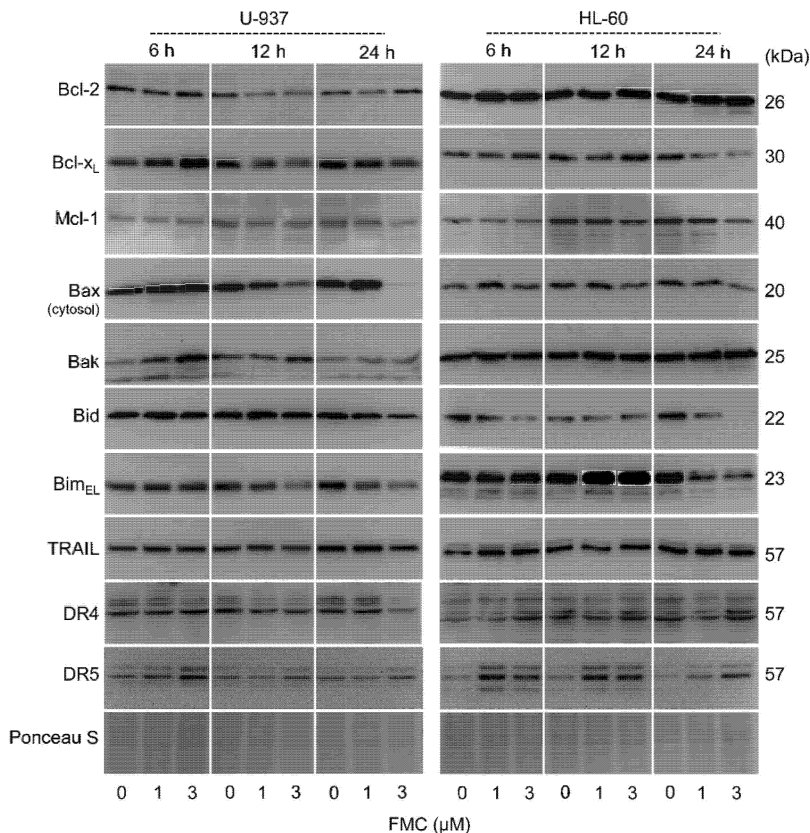


Fig. 8. FMC induced changes in BCL-2 family proteins expression, TRAIL and Death Receptors. Cells were treated with the indicated concentrations of FMC for the specified times and whole cell lysates or cytosolic fractions (in the case of Bax) were subjected to immunoblotting. Ponceau S was used as a loading and transfer control. A representative section of the membrane is shown.

including two cyclic compounds either with or without a furoyl radical and evaluated their cytotoxicity against five human tumor cell lines. The SARs revealed that (i) the presence of a 2' amino group in 4-methoxychalcone generated a more cytotoxic compound than the corresponding 2'-hydroxy against leukemic cells, and the introduction of a furoyl radical in position 2' as an ester or an amide group enhanced the cytotoxicity against leukaemia and melanoma cells; and (ii) the substitution of 2'-hydroxy for a 2'-amino group in 3,4,5-trimethoxychalcones enhanced the cytotoxicity against leukaemia and melanoma cells but the corresponding furoyl derivatives did not enhance the cytotoxicity as in the case of 4-methoxychalcones. The 4-methoxychalcone containing a furoxyloxy radical at 2' on the A ring (FMC) was one of the most potent cytotoxic compound of this series against the human leukaemia U-937, HL-60, MOLT-3 cells and the human melanoma cell line MEL-HO. Interestingly, FMC showed less cytotoxic potential against normal cells, as the human peripheral blood mononuclear cells and the fibroblast-like Vero cells, suggesting that this compound may have therapeutic potential. FMC arrested the cells in the G₂-M phase, induced the cell cycle inhibitor p21^{Cip1/WAF1} and inhibited the polymerization of

tubulin. Cell death induced by FMC was associated with caspase activation, PARP cleavage, cytochrome c release from mitochondria, induction of the Death Receptor 5, changes in Bcl-2 family proteins expression and the over-expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 blocked the increase in the percentage of sub-G₁ cells. The mechanism of cell death appeared to be related to the generation of reactive oxygen species (ROS) since FMC induced ROS and the antioxidant enzyme catalase was able to block ROS and cell death.

5. Material and methods

5.1. General method and reagents

¹H and ¹³C NMR spectra were obtained on a Bruker Ascen 400 spectrometer model with standard pulse sequences operating at 400 MHz in ¹H and 101 MHz in ¹³C NMR. Chemical shifts (δ) are given in ppm upfield from tetramethylsilane as internal standard. Coupling constants (*J*) are reported in hertz. EIMS and HREIMS were recorded on a Micromass model Autospec (70 eV) spectrometer. Column

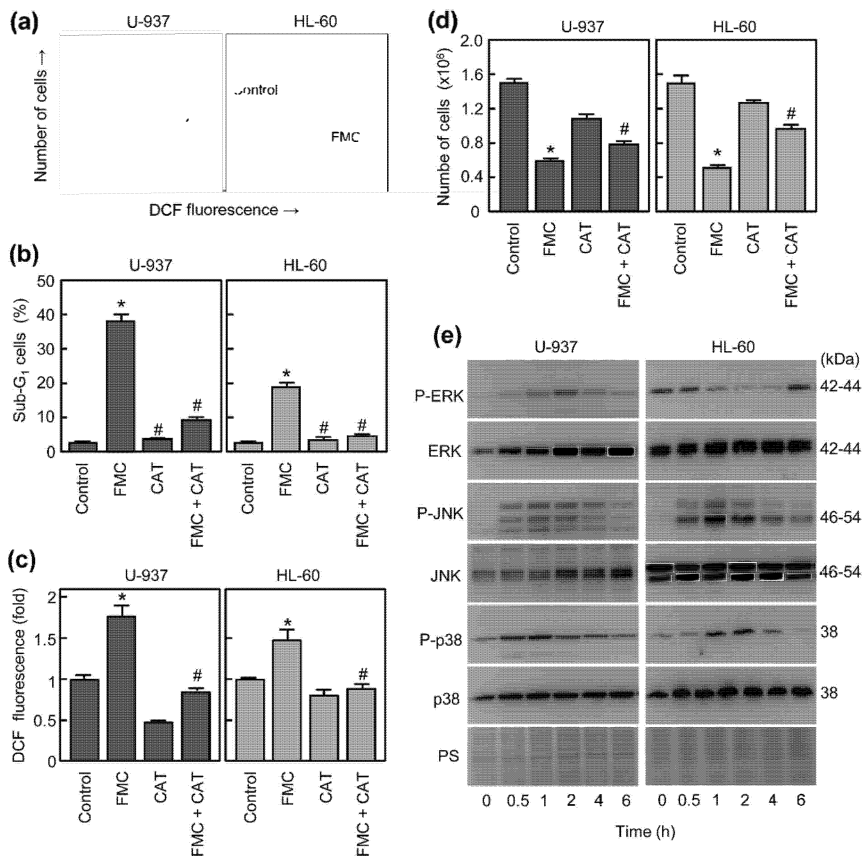


Fig. 9. FMC induced ROS generation and MAPK activation. (a) Representative histograms of fluorescence obtained by flow cytometry after treatment with 3 μ M FMC for 3 h. (b) Cells were preincubated with catalase (CAT, 500 UI/mL) for 1 h and then treated for 24 h with 3 μ M FMC and the percentage of sub-G₁ cells was determined by flow cytometry. (c) Cells were preincubated with catalase for 1 h and then with 3 μ M FMC for 3 h and the fluorescence of oxidized H₂DCF was determined by flow cytometry. (d) Cells were treated as in (b) and the number of cells was determined by the trypan blue exclusion method. (e) Cells were treated with 3 μ M FMC for the specified times and MAPK phosphorylation was detected by immunoblotting. Membranes were stripped and reprobed with total ERK, total JNK or total p38 antibodies as loading controls. Ponceau S (PS) staining was also used as alternative loading as well as transfer control. * $P < 0.05$ from untreated control. # $P < 0.05$ significantly different from FMC treatment.

chromatography was carried out on silica gel 60 (Merck 230–400 mesh) and analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using silica gel aluminum sheets. The general inhibitor of caspases z-VAD-fmk [benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe) fluoromethyl ketone] was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Ammonium persulfate, acrylamide, bisacrylamide and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Poly(vinylidene difluoride) membranes and Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate were from Millipore (Billerica, MA, USA). All other chemicals were obtained from Sigma (Saint Louis, MO, USA). The primary antibodies used for immunoblots were obtained from the following companies (all at 1:1,000 dilution): anti-Bak (#12105), anti-Bax (#2772), anti-Bcl-2 (#4223), anti-Bcl-xL (#2764), anti-Bid (#2002), anti-Bim (#2933), anti-caspase-7 (#9494), anti-caspase-8 (#9746), anti-caspase-9 (#9502), anti-Mcl-1 (#4572),

anti-JNK/SAPK (#9252), anti-phospho-JNK/SAPK (phospho T183 + Y185) (#9251), anti-p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) (#9102), anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101), anti-p38^{MAPK} (#9212), anti-phospho-p38^{MAPK} (T180/Y182) (#9211), anti-p21 (#2947) and anti- α -tubulin (#2125) antibodies from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-caspase-3 (#ADI-AAP-113) was from Enzo (Ann Arbor, MI, USA); anti-cytochrome c (556433) and anti-PARP [poly(ADP-ribose) polymerase] (#551024) were from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-DR4 (ab8414), anti-DR5 (ab47179) and anti-TRAIL (ab9959) were from Abcam (Cambridge, UK). Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (#A-11012) was from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Anti- β -actin (clone AC-74, A2228) was from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (NA9310 and NA9340)

from GE Healthcare (Little Chalfont, UK) were used at 1:10,000 dilution.

5.2. General procedure for the synthesis of chalcones (1, 3, 5, 7, 9, 11)

A mixture of the acetophenone (5–10 mmol, 1 equiv) and the corresponding benzaldehyde (1 equiv) in EtOH (20–40 mL) was stirred at room temperature and a 50% aqueous solution of NaOH (5–8 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature until the starting materials had been consumed. HCl (10%) was then added until neutrality. Precipitated chalcones were generally filtered and crystallized from MeOH, although in some cases the product was purified using column chromatography.

5.3. General procedure for the synthesis of furoyl derivatives (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)

Furoyl chloride (1.1 equiv) was added, at room temperature under argon, to a solution of 2'-hydroxychalcone (approx. 0.05 mmol, 1.0 equiv) and triethylamine (1.5 equiv) in dry CH₂Cl₂ (0.1 M). After being stirred for 6 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted twice with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed twice with saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄ and filtered. The filtrate was concentrated in vacuum, and then the resulting residue was purified by column chromatography (eluted with Hex:Ethyl Acetate = 3:1) on silica gel to afford the furoyl derivatives (2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14).

5.4. Procedure for the synthesis of flavonol (13)

A solution of the 2-hydroxychalcone 1 (0.1–0.2 mmol) in 3.0 M KOH in MeOH (2–3 mL) was cooled at 0 °C. An aqueous solution of H₂O₂ (30%) (0.5 mL) was added to the chalcone solution. The resulting mixture was stirred at room temperature, until the starting material was totally consumed (as evidenced by TLC). The reaction mixture was cooled in an ice bath and distilled water (2–4 mL) was added together with HCl (2 M) until pH 2. The precipitate was filtered and washed with distilled water and recrystallized from MeOH.

5.5. Spectroscopic data of compounds 1–14

5.5.1. (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (1): Orange amorphous solid (82%)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.48–7.38 (m, 2H), 7.38–7.32 (m, 2H), 7.30 (dd, *J* = 3.5, 0.9 Hz, 1H), 7.29–7.22 (m, 3H), 7.17 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.15–7.09 (m, 1H), 7.06 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 192.2, 156.9, 156.3, 148.1, 147.3, 143.5, 139.5, 139.4, 136.2, 131.4, 131.0, 129.2, 128.5, 128.4, 127.9, 127.0, 126.2, 124.8, 123.3, 119.8, 118.7, 115.6, 112.1, 110.5, 70.7. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 277.0846 [M + Na]; calcd. for C₁₆H₁₄NaO₃: 277.0837.

5.5.2. (E)-2-[3-(4-methoxyphenyl)acryloyl]phenyl furan-2-carboxylate (2)

Yellow oil (60%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.62–7.51 (m, 3H), 7.48–7.41 (m, 2H), 7.39 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.34–7.28 (m, 2H), 7.07 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.90–6.81 (m, 2H), 6.49 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 191.4, 161.7, 156.5, 148.0, 147.2, 145.4, 143.6, 132.8, 132.2, 130.2, 129.9, 127.2, 126.2, 123.3, 123.3, 119.9, 114.3, 112.2, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 371.0897 [M + Na]; calcd. for C₂₁H₁₆NaO₅: 371.0895.

5.5.3. (E)-1-(2-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (3)

Orange amorphous solid (75%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.33–7.23 (m, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.74–6.65 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 191.8, 161.3, 150.8, 142.8, 134.1, 131.9, 129.9, 128.0, 120.8, 119.3, 117.2, 115.8, 114.3, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 276.0998 [M + Na]; calcd. for C₁₆H₁₅NaO₂: 276.1000.

5.5.4. (E)-N-[2-[3-(4-methoxyphenyl)acryloyl]phenyl]furan-2-carboxamide (4)

Yellow amorphous solid (68%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 12.57 (s, 1H), 8.87 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.69–7.55 (m, 4H), 7.49 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 3.5, 0.9 Hz, 1H), 7.20 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.2 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.56 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 193.3, 162.0, 156.9, 148.3, 145.6, 144.9, 140.7, 134.5, 130.5, 130.4, 127.4, 123.9, 122.6, 121.2, 120.3, 115.3, 114.5, 112.2, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 385.0681 [M + Na]; calcd. for C₂₁H₁₄NaO₆: 385.0688.

5.5.5. (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (5)

Orange amorphous solid (77%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12.84 (s, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.57–7.48 (m, 2H), 7.04 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.96 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 6.89 (s, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.92 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 193.5, 163.6, 153.5, 145.6, 140.8, 136.3, 130.0, 129.6, 120.0, 119.3, 118.8, 118.6, 105.9, 61.0, 56.3. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 337.1046 [M + Na]; calcd. for C₁₈H₁₈NaO₅: 337.1052.

5.5.6. (E)-2-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]phenyl furan-2-carboxylate (6)

Yellow oil (55%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.55–7.49 (m, 2H), 7.41 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.34 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.29–7.22 (m, 2H), 6.99 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 6.43 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 191.5, 161.8, 156.5, 153.4, 148.0, 147.3, 145.6, 143.6, 140.4, 132.6, 132.4, 129.9, 126.3, 125.0, 123.4, 120.0, 112.2, 105.6, 61.0, 56.1. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 431.1093 [M + Na]; calcd. for C₂₃H₂₀NaO₇: 431.1107.

5.5.7. (E)-1-[2-(benzyloxy)-6-hydroxyphenyl]-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (7)

Yellow amorphous solid (75%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.09 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.47–7.32 (m, 3H), 7.32–7.17 (m, 4H), 6.66 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 2H), 6.54 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.67 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 194.3, 164.8, 160.0, 153.2, 143.1, 140.2, 135.9, 135.8, 130.5, 128.7, 128.2, 127.2, 127.0, 112.4, 111.3, 105.8, 102.7, 71.1, 60.9, 56.0. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 443.1479 [M + Na]; calcd. for C₂₅H₂₄NaO₆: 443.1471.

5.5.8. (E)-3-(benzyloxy)-2-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]phenyl furan-2-carboxylate (8)

Pale yellow oil (48%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (dd, *J* = 1.8, 0.8 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.32 (dt, *J* = 6.0, 2.1 Hz, 3H), 7.29–7.27 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 6.95 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.52 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 192.3, 156.8, 156.4, 153.3, 147.9, 147.4, 146.2, 143.4, 140.3, 136.2, 130.8, 130.0, 128.5, 127.9, 127.3, 127.0, 123.4, 119.9, 115.5, 112.1, 110.5, 105.6, 70.6, 60.9, 56.1. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 537.1528 [M + Na]; calcd. for C₃₀H₂₆NaO₈: 537.1525.

5.5.9. (E)-1-(2-aminophenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (9)

Orange amorphous solid (78%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H), 6.85 (s, 2H), 6.77–6.66 (m, 2H), 6.32 (s, 2H), 3.92 (s, 6H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 191.5, 153.4, 150.9, 143.1, 140.1, 134.2, 130.9, 130.8, 122.4, 119.1, 117.3, 115.8, 105.5, 61.0, 56.2. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 314.1394 [M + H]⁺; calcd. for C₁₈H₂₀NO₄: 314.1392.

5.5.10. (E)-N-[2-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) acryloyl] phenyl]furan-2-carboxamide (10)

Pale yellow oil (57%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12.51 (s, 1H), 8.88 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.86–7.74 (m, 1H), 7.69–7.57 (m, 2H), 7.48 (dt, *J* = 15.4, 1.4 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.25–7.19 (m, 1H), 6.88 (t, *J* = 1.4 Hz, 2H), 6.57 (dd, *J* = 3.4, 1.7 Hz, 1H), 3.93 (s, 7H), 3.92 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 193.3, 156.9, 153.5, 148.3, 145.9, 145.0, 140.8, 140.7, 134.7, 130.6, 130.1, 123.7, 122.6, 122.0, 121.3, 115.4, 112.3, 105.8, 61.0, 56.2. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 430.1362 [M + Na]⁺; calcd. for C₂₃H₂₁NNaO₆: 430.1267.

5.5.11. (E)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (11)

Yellow amorphous solid (84%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.01 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.48 (ddd, *J* = 8.6, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.93 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 2.19 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 194.1, 163.5, 161.3, 159.6, 141.4, 136.0, 129.5, 127.4, 120.8, 120.6, 120.2, 118.7 (x2), 118.5, 106.6, 61.5, 55.8, 8.94. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 430.1362 [M + Na]⁺; calcd. for C₂₃H₂₁NNaO₆: 430.1267.

5.5.12. (E)-2-[3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) acryloyl]phenyl furan-2-carboxylate (12)

Pale yellow oil (42%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.61–7.53 (m, 2H), 7.42–7.35 (m, 2H), 7.35–7.29 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.13 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 191.8, 161.0, 159.3, 156.5, 148.0, 147.2, 143.7, 141.4, 132.9, 132.1, 129.9, 126.5, 126.1, 124.2, 123.3, 120.7, 120.3, 119.8, 112.1, 106.5, 61.5, 55.7, 8.8. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 415.1154 [M + Na]⁺; calcd. for C₂₃H₂₀NaO₆: 415.1158.

5.5.13. 3-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one (13)

Pale yellow amorphous solid (79%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H), 7.70 (ddd, *J* = 8.6, 7.0, 1.7 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.41 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.16, 161.12, 155.31, 145.34, 137.65, 133.38, 129.55, 125.42, 124.45, 123.56, 120.74, 118.20, 114.12, 55.44. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 291.0633 [M + Na]⁺; calcd. for C₁₆H₁₂NaO₄: 291.0633.

5.5.14. 2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl furan-2-carboxylate (14)

White amorphous solid (60%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.76–7.65 (m, 2H), 7.57 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.47–7.40 (m, 2H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.60 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.8, 162.0, 156.4, 155.5, 155.4, 147.4, 143.4, 133.8, 132.5, 130.1, 126.2, 125.1, 123.6, 122.1, 120.3, 118.0, 114.2, 112.3, 55.4. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: 385.0681 [M + Na]⁺; calcd. for C₂₁H₁₄NaO₆: 385.0688.

5.6. Cell culture

The human leukaemia U-937 (pro-monocytic, human myeloid leukaemia), HL-60 (acute myeloid leukaemia) and MOLT-3 (an acute lymphoblastic leukaemia) cells and the human melanoma SK-MEL-1 (ACC-303) and MEL-HO (ACC-62) cells were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). U-937/Bcl-2 cells were kindly provided by Dr. Jacqueline Bréard (INSERM U749, Faculté de Pharmacie Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France). Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin, incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ as described [40]. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood anticoagulated with heparin of healthy donors by centrifugation with Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). PBMC were also stimulated with phytohemagglutinine (2 µg/mL) for 48 h before the experimental treatment. Viability was always >95% in all experiments as determined by the trypan blue exclusion method.

5.7. Cytotoxicity assays

The cytotoxicities of synthetic compounds were evaluated by colorimetric MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assays as described [41]. Compounds were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) and kept under dark conditions at 25 °C. Before each experiment, compounds were dissolved in culture media at 37 °C. The final concentration of DMSO did not exceed 0.3% (v/v). Cells (5,000 per well) were incubated with increasing concentrations of compounds for 72 h into a 96-well plate. Then, the supernatant was removed and MTT (0.5 mg/mL) was added and incubated at 37 °C for 4 h and the reaction products were solubilized with sodium dodecyl sulfate (10% w/v) in 0.05 M HCl overnight under dark conditions. Absorbance was measured at 570 nm using an ELISA reader (Bio-Rad) and the IC₅₀ values were determined graphically for each experiment by a nonlinear regression using the curve-fitting routine implemented within the software Prism 5.0 (GraphPad).

5.8. Soft agar colony formation assay

Cells (1,000) were grown in a layer of soft agar (0.3% w/v) mixed with RPMI 1640 cell culture medium that rested on another layer of soft agar (0.5% w/v), also mixed with RPMI 1640 medium in 6-well plates and incubated with the indicated concentrations of FMC or etoposide for twelve days. Then, cells were stained by adding 200 µL of nitroblue tetrazolium chloride solution (1 mg/mL in PBS) per well and plates were incubated overnight at 37 °C.

5.9. Evaluation and quantification of apoptosis by fluorescent microscopy and flow cytometry

Fluorescence microscopy analysis was carried out as previously described. Briefly, following treatments the cells were washed with PBS, fixed in 3% paraformaldehyde, stained with 20 µg/mL of bisbenzimidide trihydrochloride (Hoechst 33258) and visualized with fluorescent microscope (Zeiss-Axiover). Flow cytometric analysis of propidium iodide-stained nuclei and of double staining annexin V-FITC and propidium iodide cells was performed using a BD FACSVersTM cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) as previously described [41].

5.10. Tubulin polymerization assay

In vitro tubulin polymerization assays were performed with reagents as described by the manufacturer (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA). Briefly, increasing concentrations of FMC were incubated with purified bovine brain tubulin in a buffer containing 1 mM GTP and 10% glycerol

at 37 °C, and the increase in absorbance was measured at 340 nm in a Beckman Coulter DTX880 microplate reader at 37 °C and recorded every 30 s for 50 min.

5.11. Immunocytochemistry

Cells were treated with 3 μ M FMC for 12 h and processed for immunofluorescence using a monoclonal antibody against α -tubulin. Briefly, after treatments cells were pelleted by centrifugation at 500 \times g for 10 min, washed with PBS and adhered by cyto-centrifugation on microscope slides. Adherent cells were fixed for 10 min at room temperature with 3% paraformaldehyde, washed once with PBS for 5 min, then 0.1 M glycine for 5 min at room temperature, followed with PBS, permeabilized (0.25% Triton X-100), washed with PBS and blocked with 5% BSA and 5% normal goat serum in PBS containing 0.025% Triton X-100 for 1 h. After washing twice with PBS, cells were incubated with 1% BSA in PBS containing 0.025% Triton X-100 containing anti- α -tubulin monoclonal antibody (#2125, Cell Signaling Technology, 1:100 dilution) overnight at 4 °C. After washing with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (Invitrogen, 1:1,000 dilution) in the dark for 90 min. Then, cells were rinsed with PBS and mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1.5 μ g/mL). Cellular microtubules images were obtained by using an inverted Nikon Eclipse 80i microscope with a 40x objective.

5.12. Assay of caspase activity

Caspase activity was determined in cell lysates using specific colorimetric substrates. Briefly, cells were treated with 3 μ M for different time periods (6 h-24 h), harvested by centrifugation (1000x g for 5 min at 4 °C), washed with PBS, lysed with a buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.1% Chaps), spun (17,000 \times g for 10 min at 4 °C) and the supernatants normalized by protein concentration were used to determine caspase activity. The net increase of absorbance at 405 nm after incubation at 37 °C was indicative of enzyme activity. The colorimetric substrates were DEVD-pNA (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroaniline), IETD-pNA (N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline) and LEHD-pNA (N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroaniline) for caspase-3/7, -8 and -9 activities, respectively.

5.13. Western blot analysis and subcellular fractionation

Whole cell lysates and cytosolic fractions were subjected to immunoblot analysis as previously described. For whole cell lysates, cell pellets were resuspended in lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 137 mM NaCl, 20 mM sodium β -glycerophosphate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM tetrasodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100 plus the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1 mM), aprotinin, leupeptin and pepstatin A (1 μ g/mL each)], homogenized by a sonifier (five cycles) and centrifuged at 11,000x g for 10 min at 4 °C. Equal amounts of proteins from supernatants were loaded on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (10% for MAPKs and 12.5% for caspases and Bcl-2 family proteins). Proteins were electrophoretically transferred to poly(vinylidene difluoride) membranes and detected by enhanced chemiluminescence. For subcellular fractionation, cells were washed twice with PBS and then resuspended in ice-cold buffer [20 mM HEPES (pH 7.5), 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and 1 mM dithiothreitol containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF and 1 μ g/mL leupeptin, aprotinin and pepstatin A)]. After 15 min on ice, cells were lysed by pushing them several times through a 22-gauge needle, and the lysate was centrifuged at 1,000x g for 5 min at 4 °C. This pellet was used as a nuclear fraction. The supernatant fraction was centrifuged at 105,000x g for 45 min at 4 °C, and the resulting supernatant was used as the soluble cytosolic fraction.

5.14. Analysis of mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ and intracellular reactive oxygen species (ROS) determination

The mitochondrial membrane potential and intracellular ROS production were determined by flow cytometry using the fluorochromes 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, 5 μ g/mL) and 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCF-DA, 10 μ M), respectively. Flow cytometric analysis was performed using a BD FACSVerse™ cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and has been described in detail elsewhere [42].

5.15. Statistical methods

Statistical differences between means were tested using (i) Student's *t*-test (two samples) or (ii) one-way analysis of variance (ANOVA) (3 or more samples) with Tukey's test used for a posteriori pairwise comparisons of means. A significance level of *P* < 0.05 was used.

Funding

This research was funded by Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (grant number CEI2019/05) and in part by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund (PGC2018-094503-B-C21 and PGC2018-094503-B-C22).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

E.S. was supported by the Fundación Instituto Canario de Investigación del Cáncer. E. S.-L. is recipient of a predoctoral fellowship of Consejería de Economía, Conocimiento y Empleo del Gobierno de Canarias in co-financing with Fondo Social Europeo (TESIS2020010081).


Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105926>.

References

- [1] K.D. Miller, M. Fidler-Benaoudia, T.H. Keegan, H.S. Hipp, A. Jemal, R.L. Siegel, Cancer statistics for adolescents and young adults, *CA Cancer J. Clin.* 70 (2020) (2020) 443–459, <https://doi.org/10.3322/caac.21637>.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (3) (2021) 209–249, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [3] K.D. Miller, L. Nogueira, A.B. Mariotto, J.H. Rowland, K.R. Yabroff, C.M. Alfano, A. Jemal, J.L. Kramer, R.L. Siegel, Cancer treatment and survivorship statistics 2019, *CA Cancer J. Clin.* 69 (2019) (2019) 363–385, <https://doi.org/10.3322/caac.21565>.
- [4] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (4) (2007) 495–516, <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [5] O. Julien, J.A. Wells, Caspases and their substrates, *Clin. Death Differ.* 24 (8) (2017) 1380–1389, <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>.
- [6] B.A. Carneiro, W.S. El-Deiry, Targeting apoptosis in cancer therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17 (7) (2020) 395–417, <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- [7] L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Alzuci, I. Amelio, D.W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arana, E.H. Baehrecke, N.A. Barlev, N.G. Bazan, F. Bernassola, M.J. B. Bertrand, K. Bianchi, M.V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F.-M. Chan, N.S. Chandel, E.H. Cheng, J.E. Chipuk, J.A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J.R. Cubillos-Ruiz, P.E. Czabotar, V. D'Angioliella, T. M. Dawson, V.L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.-M. Debatin, R.

- J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V.M. Dixit, S.J. Dixon, C.S. Duckett, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, J.W. Elrod, G.M. Fimia, S. Fulda, A. Garcia-Siez, A.D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L.A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, I. S. Harris, M.O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, P. Jänttinen, B. Joseph, P.J. Jost, P. Juin, W.J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R.N. Kitzis, D. J. Klionsky, R.A. Kumar, S. Kumar, S.W. Lee, J.J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S.A. Lipton, R.A. Lockshin, C. López-Otin, S.W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J.-C. Marine, S.J. Martin, J.-C. Martinou, J.P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E.A. Miao, J.D. Molkenitin, U.M. Joll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J.M. Penninger, D.M. Pereira, S. Pervaiz, M.E. Peter, M. Piccinini, P. Pinton, J.H.M. Prehn, H. Puthalakath, G.A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C.M.P. Rodrigues, D.C. Rubinstein, T. Rudel, K.M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H.-U. Simon, A. Sistig, B.R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S.W.G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M.G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K.H. Vousden, D. Vucic, E.F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J.A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovskiy, I. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell Death Differ.* 25 (3) (2018) 486–541, <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- [8] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.* 83 (3) (2020) 770–803, <https://doi.org/10.1021/acscjnatprod.9b01285>.
- [9] E.R. Sauter, Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 13 (3) (2020) 265–285, <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218>.
- [10] D. Ravishanker, A.K. Rajora, F. Greco, H.M.I. Osborn, Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (12) (2013) 2821–2831, <https://doi.org/10.1016/j.ijbc.2013.10.004>.
- [11] D. Raffa, B. Maggio, M.V. Raimondi, F. Plescia, G. Daidone, Recent discoveries of anticancer flavonoids, *Eur. J. Med. Chem.* 142 (2017) 213–228, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034>.
- [12] C. Forni, M. Rossi, I. Borromeo, G. Feriotto, G. Platanoone, C. Tabolacci, C. Michiatti, S. Beninati, Flavonoids: a myth or a reality for cancer therapy? *Molecules* 26 (2021) 3583, <https://doi.org/10.3390/molecules26123583>.
- [13] S. Shukla, A.K. Sood, K. Goyal, A. Singh, V. Sharma, N. Guliyi, S. Gulati, S. Kumar, Chalcone scaffolds as anticancer drugs: a review on molecular insight in action of mechanisms and anticancer properties, *Anticancer Agents Med. Chem.* 21 (13) (2021) 1650–1670, <https://doi.org/10.2174/187152062099201124212840>.
- [14] Y. Ouyang, J. Li, X. Chen, X. Fu, S. Sun, Q. Wu, Chalcone derivatives: role in anticancer therapy, *Biomedicines* 11 (2021) 894, <https://doi.org/10.3390/biomed11060894>.
- [15] K.C. Nicolau, A.J. Pfefferkorn, H.J. Mitchell, A.J. Roeker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R.L. Affleck, J.E. Lillig, Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 2. construction of a 10 000-membered benzopyran library by directed split-and-pool chemistry using NanoKems and optical encoding, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 9954–9967, <https://doi.org/10.1021/ja002034c>.
- [16] M.D. Delost, D.T. Smith, B.J. Anderson, J.T. Njardarson, From oxiranes to oligomers: architectures of U.S. FDA approved pharmaceuticals containing oxygen heterocycles, *J. Med. Chem.* 61 (24) (2018) 10996–11020, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00876>.
- [17] P.A. Wender, V.A. Verma, T.J. Paxton, T.H. Pillow, Function-oriented synthesis, step economy, and drug design, *Acc. Chem. Res.* 41 (1) (2008) 40–49, <https://doi.org/10.1021/ar700155p>.
- [18] P. Harris, P. Ralph, Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines, *J. Leukoc. Biol.* 37 (4) (1985) 407–422, <https://doi.org/10.1002/jlb.37.4.407>.
- [19] W. Chanput, V. Peters, H. Wichers, THP-1 and U937 cells, in: K. Verhoeven, P. Cotter, I. López-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, Springer, 2015, pp. 147–159.
- [20] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, Z. Miao, Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry, *Chem. Rev.* 117 (12) (2017) 7762–7810, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00202>.
- [21] S. Zhuang, J.T. Demiris, I.E. Kochevar, p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 275 (275) (2000) 25939–25948, <https://doi.org/10.1074/jbc.M001185200>.
- [22] M. Watabe, H. Kakeya, H. Osada, Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis, *Oncogene* 18 (37) (1999) 5211–5220, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202901>.
- [23] S.G. Shiah, S.E. Chuang, Y.P. Chau, S.C. Shen, M.L. Kuo, Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway, *Cancer Res.* 59 (1999) 391–398.
- [24] Y.-R. Chen, W. Wang, A.-N. Kong, T.-H. Tan, Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates, *J. Biol. Chem.* 273 (3) (1998) 1769–1775, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1769>.
- [25] D. Cao, X. Han, G. Wang, Z. Yang, F. Peng, L. Ma, R. Zhang, H. Ye, M. Tang, W. Tu, K. Lei, J. Wen, J. Chen, J. Qiu, X. Liang, Y. Ran, Y. Sang, M. Xiang, A. Peng, L. Chen, Synthesis and biological evaluation of novel pyranochalcone derivatives as a new class of microtubule stabilizing agents, *Eur. J. Med. Chem.* 62 (2013) 579–589, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.007>.
- [26] S. Kraege, K. Stefan, S.C. Köhler, M. Wiese, Optimization of acryloylphenylcarboximides as inhibitors of ABG2 and comparison with acryloylphenylcarboxylates, *ChemMedChem* 11 (22) (2016) 2547–2558, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600455>.
- [27] T. Walle, N. Tsai, T. Kawamori, X. Wen, P.A. Tsuji, U.K. Walle, Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids—methylated versus unmethylated flavones, *Biochem. Pharmacol.* 73 (9) (2007) 1288–1296, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.12.028>.
- [28] T. Walle, Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin. Cancer Biol.* 17 (5) (2007) 354–362, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.05.002>.
- [29] A.A. Sy-Cordero, T.N. Graf, S.P. Runyon, M.C. Wani, D.J. Kroll, R. Agarwal, S. J. Brantley, M.F. Paine, S.J. Polyak, N.H. Oberlies, Enhanced bioactivity of silybin B methylation products, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (3) (2013) 742–747, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.035>.
- [30] F. Grande, O.L. Parisi, R.A. Mordocco, C. Rocca, F. Pucci, L. Scrivano, A. M. Quintieri, P. Cantafio, S. Ferla, A. Brancalle, S. Saturnino, M.C. Cerra, M. S. Sinicropi, T. Angelone, Quercetin derivatives as novel antihypertensive agents: synthesis and physiological characterization, *Eur. J. Pharm. Sci.* 82 (2016) 161–170, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.021>.
- [31] M.K. Kim, K.-S. Park, C. Lee, H.R. Park, H. Choo, Y. Chong, Enhanced stability and intracellular accumulation of quercetin by protection of the chemically or metabolically susceptible hydroxyl groups with a pivaloxymethyl (POM) promotomy, *J. Med. Chem.* 53 (24) (2010) 8597–8607, <https://doi.org/10.1021/jm101252u>.
- [32] J.A. Beutler, E. Hamel, A.J. Vlietinck, A. Haemers, P. Rajan, J.N. Roltman, J. H. Cardellino, M.R. Boyd, Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin, *J. Med. Chem.* 41 (13) (1998) 2333–2338, <https://doi.org/10.1021/jm970842h>.
- [33] F. Estévez-Sarmiento, M. Said, I. Brouard, F. León, C. García, J. Quintana, F. Estévez, 3'-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavone blocks tubulin polymerization and is a potent apoptotic inducer in human SK-MEL-1 melanoma cells, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (21) (2017) 6060–6070, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.043>.
- [34] S. Rubio, J. Quintana, J.L. Eiroa, J. Triana, F. Estévez, Butelutole 3-methyl ether induces G₂M phase arrest and activates the sphingomyelinase and MAPK pathways in human leukemia cells, *Mol. Carcinog.* 49 (1) (2010) 32–43, <https://doi.org/10.1002/mc.20574>.
- [35] F. Torres, J. Quintana, F. Estévez, 5,7,3'-trihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway, *Mol. Carcinog.* 49 (2010) 464–475, <https://doi.org/10.1002/mc.20619>.
- [36] J.C. Goldstein, C. Muñoz-Pinedo, J.-E. Ricci, S.R. Adams, A. Kelekar, M. Schuler, R. Y. Tsien, D.R. Green, Cytochrome c is released in a single step during apoptosis, *Cell Death Differ.* 12 (5) (2005) 453–462, <https://doi.org/10.1038/cdd.4401596>.
- [37] E. Bossy-Wetzel, U.D. Newmeyer, D.R. Green, Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization, *EMBO J.* 17 (1998) 37–49, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.37>.
- [38] J.N. Moloney, T.G. Cotter, ROS signalling in the biology of cancer, *Semin. Cell Dev. Biol.* 80 (2018) 50–64, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.
- [39] Q. Peng, Z. Deng, H. Pan, L. Gu, O. Liu, Z. Tang, Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer, *Oncol. Lett.* 15 (2018) 1379–1388, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7491>.
- [40] E. Saavedra, H. Del Rosario, I. Brouard, J. Quintana, F. Estévez, 6'-Benzyloxy-4-bromo-2'-hydroxychalcone is cytotoxic against human leukemia cells and induces caspase-8- and reactive oxygen species-dependent apoptosis, *Chem. Biol. Interact.* 298 (2019) 137–145, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.12.010>.
- [41] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1–2) (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [42] F. Estévez-Sarmiento, E. Hernández, I. Brouard, F. León, C. García, J. Quintana, F. Estévez, 3'-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavone-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and reactive oxygen species and attenuated by the inhibition of JNK/SAPK, *Chem. Biol. Interact.* 288 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.04.006>.



En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de un conjunto de flavonoides sintéticos, con diferentes patrones de sustitución, frente a varias líneas celulares tumorales humanas. El derivado conteniendo un anillo de furano (i) fue más potente que el agente antineoplásico etopósido en las células de leucemia humana U-937 y HL-60, (ii) mostró menos citotoxicidad frente a células sanas, (iii) indujo la generación de las especies reactivas de oxígeno y (iv) bloqueó la polimerización de tubulina.

