



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Y
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLÓGÍA,
GENÉTICA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado:

Obtención, Preparación y Evaluación Biológica de Fármacos de Origen Marino y
Terrestre
(Programa Interdepartamental)

TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE FLAVONOIDES
SINTÉTICOS EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS**

**Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran
Canaria presentada por la Licenciada: D^a. María de las Mercedes Said Quintana**

La Doctoranda

El Director

El Director

**M^a de las Mercedes
Said Quinatana**

**Dr. Francisco
Estévez Rosas**

**Dr. José
Quintana Aguiar**

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de Septiembre de 2015



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

D. Francisco Estévez Rosas, Catedrático y D. José Quintana Aguiar, Profesor Titular, ambos del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología Genética e Inmunología, como directores del trabajo presentado en esta memoria:

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “*Evaluación de la actividad antiproliferativa de flavonoides sintéticos en células leucémicas humanas*” ha sido realizada por D^a. María de las Mercedes Said Quintana, licenciada en Ciencias del Mar por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo nuestra dirección en las dependencias de este departamento durante los años 2011–2015.

AUTORIZAN:

La defensa de la presente memoria, dado que reúne los requisitos de calidad necesarios para constituir la Tesis Doctoral, que la citada licenciada presenta para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en el Programa de los Departamentos de Química y Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología titulado Obtención, Preparación y Evaluación Biológica de Fármacos de Origen Marino y Terrestre.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, extienden la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de Septiembre de 2015.

Fdo. D. Francisco Estévez Rosas

Fdo. D. José Quintana Aguiar

*Los objetivos se alcanzan con esfuerzo
y con el cariño de tus seres queridos.*

Anónimo

Este trabajo ha sido financiado por:

- Ministerio de Ciencia e Innovación de España y FEDER. Plan Nacional de Biomedicina. SAF 2010–21380.
- Subvención para equipamiento e infraestructura científico–tecnológica. Convocatoria 2010–2011. Ministerio de Ciencia e Innovación de España y FEDER. UNLP10–3E–947.

Ilustración de la contraportada: Estructura química del 3',4'–dibenciloxiflavonol.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Francisco Estévez Rosas y el Dr. José Quintana Aguiar porque sin ellos no podría haber realizado esta tesis, gracias por la dedicación y la ilusión que han puesto en este trabajo y sobre todo gracias por confiar en mí.

Gracias al Dr. Ignacio Brouard, del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (CSIC) por su aportación en la síntesis de los compuestos.

Quisiera darle las gracias a mis compañeros de laboratorio, con los que he disfrutado y compartido tantos buenos ratos durante estos años. Gracias a la Dra. Sara Rubio por sus consejos, a Mayte Marrero por enseñarme las técnicas y por su paciencia, a la Dra. Olga Burmistrova por compartir las noches en el laboratorio y por estar pendiente de mí, al Dr. Juan Perdomo por ayudarme con mis dudas y por sus divertidas bromas y a Elisa Hernández por nuestras charlas y por su apoyo. Gracias a la Dra. Inmaculada Hernández y al Dr. Ignacio González por su cariño.

Al Dr. Carlos Trabaue y al Dr. Javier Cabrera quiero agradecerles sus consejos y los ánimos que me han dado durante estos años. Quiero agradecer su ayuda a Olivia Rodríguez y a José Manuel Pérez del Servicio de Microscopía Electrónica (ULPGC).

En especial, agradezco a David Curtelin que me regalase este ordenador, con el que he escrito la tesina y la tesis. Gracias por acompañarme a horas intempestivas al laboratorio y sobre todo, gracias por compartir tu vida conmigo.

A mis padres Paula Quintana Segura y José Said García simplemente decirles que les quiero y que les agradezco todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí. Gracias a mis hermanas Escarlata, Paola y Arminda, a mis cuñados Adrián, Abel y Juanjo y a mis sobrinos Ana, Elena, Paola, Juanjo, Carlos e Isabel por su apoyo.

Merci a mon pépé, Jacques Curtelin, pour vos conseils et pour votre tendresse et soutien inconditionnelles.

Le quiero dar las gracias a todas mis amigas y amigos porque tienen la capacidad de sacarme una sonrisa cuando más lo necesito.

Por último le quiero agradecer a Aarón Trujillo Santana haberme cuidado durante nuestros años de amistad. Gracias por permitirme disfrutar de muchos momentos especiales con tu maravillosa familia.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 El cáncer	11
1.2 Apoptosis	14
1.3 Caspasas	14
1.4 Vía extrínseca: Receptores de muerte	17
1.5 Vía intrínseca	18
1.6 Proteínas de la familia Bcl-2	18
1.7 Ciclo celular	20
1.8 Inhibición de la proliferación celular	22
1.9 Especies reactivas de oxígeno	23
1.10 Proteínas quinasas activadas por mitógenos	24
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 Agentes farmacológicos	33
3.2 Reactivos	34
3.3 Determinación de la viabilidad celular	36
3.4 Cultivos celulares	36
3.4.1 Cultivo de células de leucemia mieloide humana HL-60, U937 y K562 y de células de leucemia linfocítica humana Molt-3	36
3.4.2 Cultivo de células U937/Bcl-2, que sobreexpresan el gen humano Bcl-2	36
3.4.3 Cultivo de células K562/ADR	36

3.5 Tratamiento con los compuestos	37
3.6 Evaluación de la citotoxicidad	37
3.7 Evaluación de la fragmentación del ADN	38
3.8 Evaluación de la morfología nuclear mediante tinción con el fluorocromo trihidrocloruro de bisbencimida	38
3.9 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	39
3.10 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	39
3.11 Determinación de la actividad caspasa	40
3.12 Inmunodetección de proteínas	40
3.13 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS)	42
3.14 Métodos estadísticos	42
4 RESULTADOS	43
4.1 El flavonoide sintético 3',4'-dibenciloxiflavonol (compuesto 40) reduce la viabilidad de células de leucemia humana	45
4.2 Evaluación de la morfología celular en células de leucemia humana tratadas con el compuesto 40	56
4.3 El compuesto 40 induce apoptosis en las células de leucemia humana	57
4.4 El compuesto 40 induce la activación de la vía de las caspasas	63
4.5 Papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por el compuesto 40	69
4.6 El compuesto 40 induce la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	71
4.7 Evaluación del papel de ROS en la inducción de apoptosis por el compuesto 40	76
5. CONCLUSIONES	79
6. BIBLIOGRAFÍA	83
7. ANEXOS	95

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas
ATP	Adenosín trifosfato
Bad	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
Bak	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
Bax	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2
Bcl-x _L	Proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2
Bid	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
BIR	Dominio de interacción proteína-proteína en las IAPs
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclina
CDK1	Proteína quinasa dependiente de ciclina 1
CDK2	Proteína quinasa dependiente de ciclina 2
CDK4	Proteína quinasa dependiente de ciclina 4
CDK6	Proteína quinasa dependiente de ciclina 6
DCF	Diacetato 2',7'-diclorofluoresceína
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DEVD-pNA	N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetra-acético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-N, N-tetraacético
ERK1/2	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Fas	Receptor de muerte, también llamado Apo1 o CD95R
FasL	Ligando del receptor de muerte Fas
FBS	Suero bovino fetal
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazino N'-(2-etanosulfónico)
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IC ₅₀	Concentración de producto que inhibe la proliferación celular a la mitad
IETD-pNA	N-Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilina
JNK	Proteína quinasa N-terminal de jun
jun	Factor de transcripción de la familia AP-1
LEHD-pNA	N-Ac-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroanilina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK	Proteína quinasa de MAPK
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAC	<i>N</i> -acetil-L-cisteína
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
p38	Proteína quinasa activada por mitógenos p38
PBS	Tampón fosfato salino
PD98059	Inhibidor de MEK1
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de Poli-vinilideno
Raf	Serina treonina quinasa (MAP-quinasa-quinasa-quinasa)
Ras	Proteína G pequeña
RING	Dominio interacción proteína-proteína
RIP	Proteína de interacción con el receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SB203580	Inhibidor de p38
SDS	Dodecil sulfato sódico
Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria
SP600125	Inhibidor de JNK
TBST	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -tetrametil-etilendiamina
Thr	Treonina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNFR
TRAF2	Factor asociado al receptor de TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
U0126	Inhibidor de MEK1 y MEK2
VEID- <i>p</i> NA	<i>N</i> -Ac-Val-Glu-Ile-Asp- <i>p</i> -nitroanilina
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
z-DEVD-fmk	Inhibidor de caspasa-3/-7
z-IETD-fmk	Inhibidor de caspasa-8
z-LEVD-fmk	Inhibidor de caspasa-4
z-LEHD-fmk	Inhibidor de caspasa-9
z-VAD-fmk	Inhibidor general de caspasas

INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer

El cáncer es la enfermedad con mayor índice de mortalidad y morbilidad a nivel mundial que ha creado un alto interés en la realización de intensos estudios que ayuden a entender el proceso patogénico y el mecanismo celular subyacente [1]. Esta enfermedad lidera la causa de muerte en los países económicamente desarrollados, en los que uno de cada cinco personas morirá de cáncer y es el segundo motivo de muerte en los países en desarrollo. La presencia de cáncer en los países desarrollados es el resultado del crecimiento y envejecimiento poblacional y además está relacionado con los hábitos de vida en estas sociedades, donde no se practica deporte, se fuma y se lleva una dieta occidental. Cerca de 12,7 millones de casos de cáncer y 7,6 millones de muertes por la misma enfermedad sucedieron en 2008 a nivel mundial. Un 56% de los casos y un 64% de las muertes tuvieron lugar en el mundo desarrollado [2].

Las células cancerosas se definen por dos propiedades: (i) se reproducen a pesar de las restricciones convencionales y (ii) ocupan territorios normalmente reservados para las células sanas. Estas dos afirmaciones convierten al cáncer en una enfermedad altamente peligrosa. Una célula que prolifera sin control producirá un tumor o neoplasma. Se conoce como tumor benigno aquel que está formado por células neoplásicas, que permanecen agrupadas en una masa única. El tumor es maligno si las células que lo componen son capaces de invadir el tejido circundante. Esta capacidad invasora implica la posibilidad de entrada de las células cancerosas en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos, dando lugar a tumores secundarios o metástasis. Los cánceres se clasifican en función del tejido y del tipo celular de origen. Los carcinomas son aquellos que proceden de células epiteliales y los sarcomas se originan en el tejido conjuntivo o a partir de células musculares. Los cánceres que no se incluyen en estas categorías son los derivados de células del sistema nervioso y las diversas formas de leucemia, originadas por las células hematopoyéticas [3]. La leucemia es un tipo de cáncer que afecta a la sangre, la médula ósea y al sistema linfático, en el que se produce un aumento desmesurado de glóbulos blancos. En función de la población de glóbulos blancos afectada y de las características de la clínica, la leucemia se puede clasificar en leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide crónica, leucemia mieloide aguda o leucemia linfoide aguda [4].

Los datos proporcionados por la Sociedad Española de Oncología Médica informan de un aumento del 5% de incidencia de cáncer en la población española. Por otro lado, existe un incremento de la supervivencia gracias a un diagnóstico temprano más preciso y por la utilización de tratamientos más eficaces [5].

Históricamente, las plantas han sido la base del cuidado de la salud y su uso en diferentes culturas está extensamente documentado [6,7]. Se ha detectado que existe un consumo de compuestos relativamente desconocidos en cuanto a la cantidad en que se administran y a su mecanismo de acción. Este hecho se ha convertido en una buena razón para considerar la revisión de la investigación en el campo de la toxicología y la nutrición, ya que se ha prestado más atención a los compuestos altamente tóxicos en bajas concentraciones que al consumo masivo de toxinas débiles [8]. La síntesis completa de productos naturales complejos ha supuesto un gran desafío científico y ha permitido avances significativos en el campo de la química orgánica durante el siglo XXI. La síntesis de productos naturales está asociada a una selección prudente y correcta de moléculas con funciones definidas, al descubrimiento e invención de nuevas estrategias sintéticas y tecnológicas y a la exploración de la bioquímica a través de diseños moleculares y estudios de mecanismos de acción. Futuros avances en este campo serán apoyados por el aislamiento y caracterización de nuevas moléculas con origen en la naturaleza, de la disponibilidad de nuevos reactivos y métodos sintéticos y de la automatización e informatización de la tecnología [9].

Los flavonoides son metabolitos secundarios producidos por las plantas que se encuentran presentes en la dieta del ser humano. Abundan en hortalizas, frutas y vegetales en general y se estima que su consumo diario es de 100 mg aproximadamente [10]. Estos compuestos polifenólicos presentan un amplio espectro de actividades biológicas (antialérgicos, antiinflamatorios, antioxidantes, antimutagénicos, anticarcinogénicos y moduladores de la actividad enzimática), que influyen en el desarrollo del cáncer. Además se ha demostrado que los flavonoides interfieren en las cuatro etapas de la carcinogénesis conocidas como iniciación, promoción, progresión e invasión [11–15]. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de flavonoides disminuye la probabilidad de sufrir cáncer [16–19].

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, con estructura fenilbenzo- γ -pirona (C₆-C₃-C₆), caracterizada por la presencia de dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un anillo heterocíclico de pirano (C) mediante un doble enlace. Se clasifican en flavonoles, antocianidinas, flavonas, flavanonas, chalconas e isoflavonas, basándose en la presencia o ausencia del doble enlace en la posición 4 del anillo C, la presencia o ausencia de un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 en el anillo C, la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo C y la presencia de un anillo bencénico en el átomo de carbono 3 del anillo C (Figura 1). Estas características influyen en la actividad biológica de los flavonoides y, en concreto, la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo B aumenta la actividad antiproliferativa y antioxidante de los flavonoles [20].

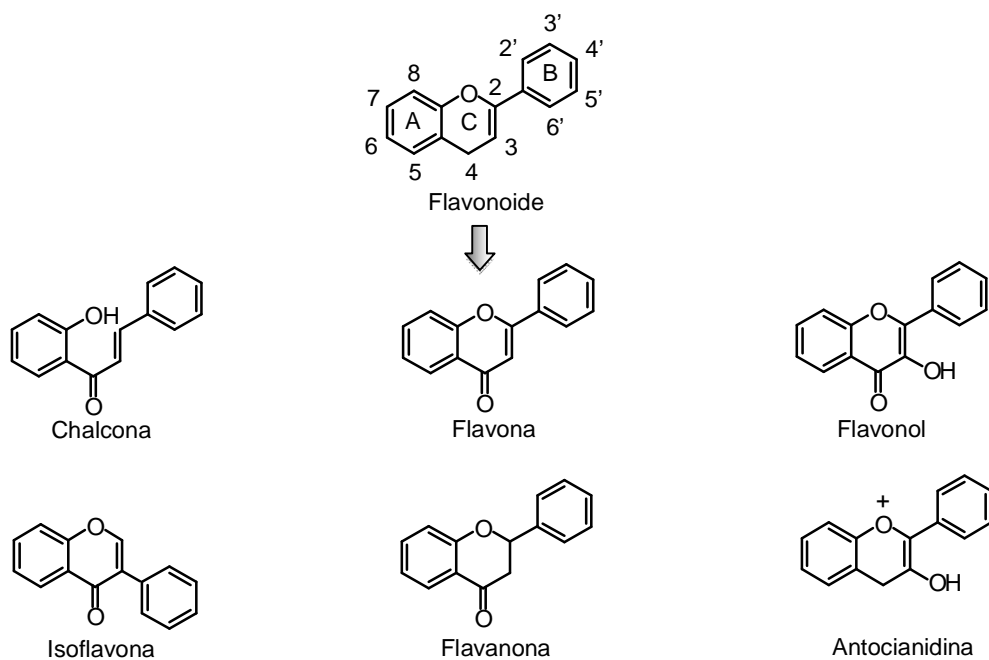


Figura 1. Estructura química de los flavonoides.

1.2 Apoptosis

La muerte celular es un proceso fundamental para el mantenimiento de la homeostasis tisular, eliminando células dañadas o indeseadas y así promover el crecimiento y la diferenciación. Se distinguen varios procesos de muerte celular: necrosis, apoptosis y autofagia [21]. La muerte celular por apoptosis se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos en las células [22–26]. En el núcleo celular estos cambios incluyen la condensación de la heterocromatina adyacente a la membrana nuclear, la fragmentación nuclear y finalmente el empaquetamiento de los fragmentos nucleares en múltiples cuerpos apoptóticos. Estos cambios morfológicos se han observado en células expuestas a agentes quimioterapéuticos y a la radiación y [27–30]. El proceso apoptótico también implica una serie de cambios bioquímicos en las células, como la rotura del ADN en fragmentos de 180–200 pares de bases, la hidrólisis de las proteínas, entre las que destacan las caspasas, y la externalización de marcadores de fagocitosis como es la fosfatidilserina, anexina I y calreticulina. Además hay pérdida del potencial de membrana mitocondrial, aumento de los niveles de Ca^{+2} y deshidratación celular [31–34]. Los macrófagos y/o células vecinas fagocitan las células apoptóticas en respuesta a la aparición de marcadores de fagocitosis en la superficie celular, evitando una respuesta inflamatoria por la exposición del material intracelular al sistema inmune [35]. Esto contrasta con la necrosis, que es inducida con el bloqueo de la actividad de las caspasas y se caracteriza morfológicamente por un aumento del volumen celular y la consiguiente salida del contenido intracelular, consecuencia de la rotura de la membrana nuclear y de la membrana plasmática, dando lugar a una respuesta inflamatoria [36].

1.3 Caspasas

La apoptosis tiene lugar a través de dos vías principales, la vía extrínseca y la vía intrínseca, en las que se produce la activación de las caspasas [37]. Todas las caspasas presentan una estructura definida que consta de un dominio *N*-terminal, cuya secuencia y longitud varía en función de la caspasa, y se sintetizan como proenzimas inactivas o zimógenos. Las caspasas presentan una región catalítica formada a su vez por dos dominios, uno grande (20 kDa) y otro pequeño (10 kDa) que dan lugar a dos subunidades de la enzima activada [38].

Las caspasas son cisteín proteasas específicas de aspartato, enzimas proteolíticas conocidas por el papel que desempeñan en la muerte celular regulada y en la inflamación [21]. La función de las caspasas se identificó con el descubrimiento de CED-3 como única caspasa ejecutora de la muerte celular durante el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* [39], mientras que la apoptosis en organismos complejos requiere la participación de varias caspasas [40]. El primer homólogo de CED-3 en mamíferos se conocía como enzima convertidora de interleuquina-1- β (ICE), después denominada caspasa-1, y Nedd2 adquirió el nombre de caspasa-2 posteriormente [21, 41-43]. Se han identificado 14 caspasas, de las cuales 12 están presentes en el ser humano. Es importante mencionar que la caspasa-5 no está presente en ratones y que las caspasas-11 y -13 son los análogos de la caspasa-4 en roedores y bovinos, respectivamente [44,45]. La caspasa-12 está presente en humanos y en roedores y la caspasa-14 se expresa en la epidermis e interviene en la protección de las capas internas de la piel [46]. Las caspasas-1, -4, -5, -11 y -12 participan en la regulación de señales inflamatorias y las caspasas-2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10 regulan el proceso apoptótico. Las caspasas apoptóticas se pueden agrupar en dos subclases, las caspasas iniciadoras (-2, -8, -9 y -10), que se caracterizan por presentar prodominios largos (>90 aminoácidos) y las caspasas efectoras (-3, -6 y -7) que tienen un prodominio corto (Figura 2). Las caspasas-8 y -10 presentan unas repeticiones de interacción proteína-proteína que se conocen como dominio efector de muerte (DED) y las caspasas-2 y -9 presentan dominios de reclutamiento de las caspasas (CARD). La presencia de estos dominios facilita la interacción con proteínas que contienen los mismos dominios. Las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) se activan por acción de las caspasas iniciadoras y son capaces de hidrolizar un gran número de proteínas.

Las células están sometidas a cambios durante el proceso apoptótico que se producen por la hidrólisis de sustratos potenciales de las caspasas. Se conocen casi 400 sustratos de caspasas en mamíferos que se encuentran almacenados en la base de datos "CASBAH" (<http://www.casbah.ie>) [47]. Los sustratos hidrolizados por las caspasas se pueden clasificar en: (i) proteínas del núcleo: proteínas asociadas a ribonucleoproteínas lamina A y B, receptor de lamina B, proteínas de unión a la estructura del cromosoma y proteínas del aparato mitótico, (ii) proteínas del citoplasma: componentes de unión a β -cateninas, gelsolina y actina, (iii) proteínas involucradas en las vías de señalización: pro-

interleuquinas, fosfolipasas y citoquinas, (iv) proteínas implicadas en el control del ciclo celular y la proliferación: p27, ubiquitinas, p21 y pRb, (v) proteínas quinasas: MAPK, PKC (proteína quinasa C) y sus isoformas, Wee1 y Akt (PKB, proteína quinasa B) y (vi) proteínas relacionadas con el metabolismo y reparación del ADN: proteínas de replicación del ADN, ADN-topoisomerasas, DNA-PKcs (proteína quinasa dependiente ADN) y PARP [poli (ADP-ribosa) polimerasa]. El proceso de muerte celular por apoptosis inducido por caspasas puede ser inhibido por una familia de supresores de la apoptosis conocida como IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis) [48]. Existen varias proteínas IAP en mamíferos: XIAP (proteína inhibidora de la apoptosis), c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP (IAP de melanoma), ILP2 (proteína 2 tipo IAP), NAIP (proteína inhibidora de apoptosis neuronal). Estas proteínas presentan: (i) al menos un dominio BIR: lugar de unión con las caspasas inhibiendo su actividad, (ii) dominios RING: inducen la autodegradación y a su vez la degradación de la caspasa unida por el proteosoma y (iii) dominios CARD: regulan la degradación de las caspasas unidas por este dominio. Diferentes IAPs, se unen y suprimen la actividad de las caspasas, funcionando como antagonistas endógenos de las proteasas de muerte celular. Las IAPs usan dominios BIR específicos para inhibir determinadas caspasas. En el caso de la XIAP, se une a las caspasas-3 y-7 a través de su dominio BIR2 y a la proteasa iniciadora, caspasa-9, a través de su dominio BIR3. La caspasas-3 y -7 son inhibidas por la proteína XIAP y en menor proporción por c-IAP1, c-IAP2 y NAIP [49,50].

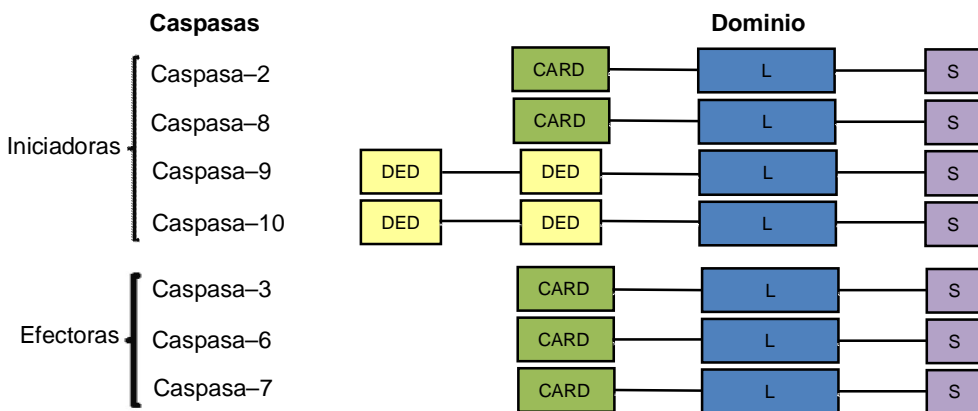


Figura 2. Clasificación de las caspasas de mamíferos que inducen el proceso apoptótico: (i) iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) y (ii) efectoras (caspasa-3, -6 y -7). CARD, dominios de reclutamiento de las caspasas, DED, dominio efector de muerte, L (subunidad larga) y S (subunidad corta).

1.4 Vía extrínseca: Receptores de muerte

El proceso apoptótico inducido por la vía de señalización extrínseca tiene lugar a nivel de la membrana celular y comienza con la unión de los correspondientes ligandos con sus receptores de muerte específicos, pertenecientes a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral (TNF): TNFR1/TNF- α , FasR/FasL, DR3, Apo3L, DR4/TRAIL y DR5/TRAIL, produciéndose el complejo de señalización inductor de muerte, DISC (Death Inducing Signaling Complex) [51]. Este complejo interviene en la activación de las caspasas iniciadoras-8 y -10. Está formado por la unión de las proteínas adaptadoras FADD (FAS-associated death domain protein) y TRADD (TNFR-associated death domain protein) y otros componentes, por medio de su dominio de muerte, DD (death domain), con las procaspasa-8 a través de DED (death effector domain) [21]. Una vez se activa, tiene lugar la activación de la caspasa-3 y posteriormente de las demás caspasas ejecutoras, dando lugar a la muerte por apoptosis (Figura 3). Además la caspasa-8 tiene la capacidad de hidrolizar a la proteína pro-apoptótica Bid, que forma parte de la familia Bcl-2. La proteína Bid se transloca a la mitocondria en su forma tBid, involucrándola en esta vía de señalización, de manera que se produce una amplificación del proceso apoptótico al activar la vía de señalización intrínseca [52].

Se han identificado múltiples moduladores de la apoptosis que contienen DED, inhibiendo o aumentando la activación de la caspasa-8. La proteína c-FLIP se presenta como un importante modulador de la caspasa-8 y la apoptosis, ya que comparte una extensa similitud en la secuencia de aminoácidos con las procaspasas-8 y -10 que contienen dos regiones N-terminal DED, seguido por un dominio pseudocaspasa que carece de los residuos críticos requeridos para la actividad proteasa, incluyendo el residuo de cisteína catalítico. En la mayoría de los casos c-FLIP se asocia con la procaspasa-8, por sus dominios DED, formando un heterodímero caspasa-8/c-FLIP, perturbando la señalización del receptor de muerte al competir con las procaspasas-8 y -10 por el enlace a FADD, impidiendo la formación del complejo de señalización inductor de muerte y la liberación de la forma activa de la caspasa-8 [53].

1.5 Vía intrínseca

La vía de señalización intrínseca se inicia en la mitocondria e implica varios estímulos apoptóticos que no están relacionados con los receptores de muerte, pero sí está controlada por las proteínas de la familia Bcl-2 [54]. Se desencadena por radiación, agentes citotóxicos o daños en el ADN y se caracteriza por una disfunción de la mitocondria, mediada por las proteínas de la familia Bcl-2, entre las que se encuentran las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), las proteínas pro-apoptóticas (Bax) y las proteínas pro-apoptóticas que muestran su homología con Bcl-2 por su dominio BH3 (Bid) (Figura 3). Estas proteínas actúan provocando un aumento de la permeabilidad la membrana mitocondrial con la consecuente liberación de moléculas solubles al citosol [55,56]. Una de estas moléculas es el citocromo c que una vez en el citosol se asocia a Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) y a la procaspasa-9 dando lugar a la formación de un complejo multimérico denominado apoptosoma, que activa la caspasa-9 [57]. Otra molécula liberada por la mitocondria es la proteína Smac/DIABLO, promotora de la apoptosis, ya que se une a las proteínas IAPs, evitando que éstas se unan a las caspasas. La proteína Htr/serínproteasa, liberada por la mitocondria, inhibe la acción de las IAPs a través de su inactivación por proteólisis. La endonucleasa G, Omi/htra2 y la proteína AIF (factor inductor de apoptosis) son moléculas liberadas por la mitocondria, que inducen la degradación del ADN en un proceso tardío de la apoptosis, siendo la endonucleasa G la principal responsable de la fragmentación del ADN y junto con las exonucleasas y la ADNasa I generan el típico patrón de fragmentación de ADN en escalera.

1.6 Proteínas de la familia Bcl-2

La muerte celular por apoptosis implica interacciones complejas entre los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Inicialmente la proteína Bcl-2 se clonó a partir del punto de corte en la translocación cromosomal t presente en la mayoría de los pacientes con un linfoma folicular no-Hodgkin de células B. Desde la clonación de Bcl-2 se identificó una familia completa de proteínas homólogas, que participan en el control de la muerte celular por apoptosis. Algunas de estas proteínas comparten la capacidad anti-apoptótica de Bcl-2, como son Bcl-x_L, Bcl-w y Mcl-1. Estas proteínas

presentan homología en la secuencia de cuatro regiones α -hélice conocidas como BH (BH1–BH4). La segunda clase de proteínas de la familia Bcl-2 entre las que se engloban las proteínas Bax y Bak, que promueven la muerte celular, sólo comparten los dominios BH1–BH3 con Bcl-2. La tercera clase de proteínas, incluye a Bid, Bim, Bad, Bik, Puma, Noxa, Bmf y Hrk. Estas proteínas sólo presentan homología con Bcl-2 a nivel de la región BH3. Al igual que Bax y Bak, las proteínas pro-apoptóticas BH3 requieren un dominio BH3 intacto para promover la apoptosis. Interacciones complejas entre los miembros de la familia Bcl-2 controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, punto en común de las señales de muerte producidas por las proteínas de esta familia. Bcl-2 es una proteína integral de la membrana mitocondrial, mientras que sus homólogos se insertan en la membrana después de un estímulo citotóxico. Niveles elevados de esta proteína inhiben el proceso apoptótico, uniéndose a los miembros pro-apoptóticos (Bax y Bak) de la familia, por la región hidrofóbica de la α -hélice del dominio BH3 de cada grupo de proteínas.

Por otra parte las proteínas anti-apoptóticas influyen en el flujo de moléculas pequeñas a través de la membrana mitocondrial. La activación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak desencadena el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que sugiere que estas proteínas son las efectoras de la familia Bcl-2 más próximas a la mitocondria. En las células los monómeros inactivos de Bax residen en el citosol, mientras que los monómeros de Bak se encuentran insertos en la membrana externa. Una vez que Bax es activada se inserta en la membrana y se homooligomerizan Bax y Bak, dando lugar al aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberándose factores apoptóticos (citocromo *c*, Omi/htra2, Smac/DIABLO, endonucleasa G y AIF) al citosol (Figura 3). La proteína pro-apoptótica Bid interactúa con las proteínas anti-apoptóticas formando heterodímeros para inducir la apoptosis. Además los dominios BH3 de Bid y Bim inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial con dependencia de las proteínas Bax y Bak, induciendo la oligomerización de estas últimas. Bid interactúa con Bcl-2, pero a su vez mantiene sus interacciones con Bax, lo que indica que las interacciones entre Bid, Bax y Bak, son importantes para la función de Bid. Bad se encuentra en su forma inactiva en el citosol, pudiendo estar asociada a la proteína 14-3-3. Durante la apoptosis, la proteína 14-3-3 se hidroliza

dando lugar a la translocación de Bad a la mitocondria, donde interactúa con Bcl-x_L y en menor medida con Bcl-2 inhibiendo su actividad protectora [58–63].

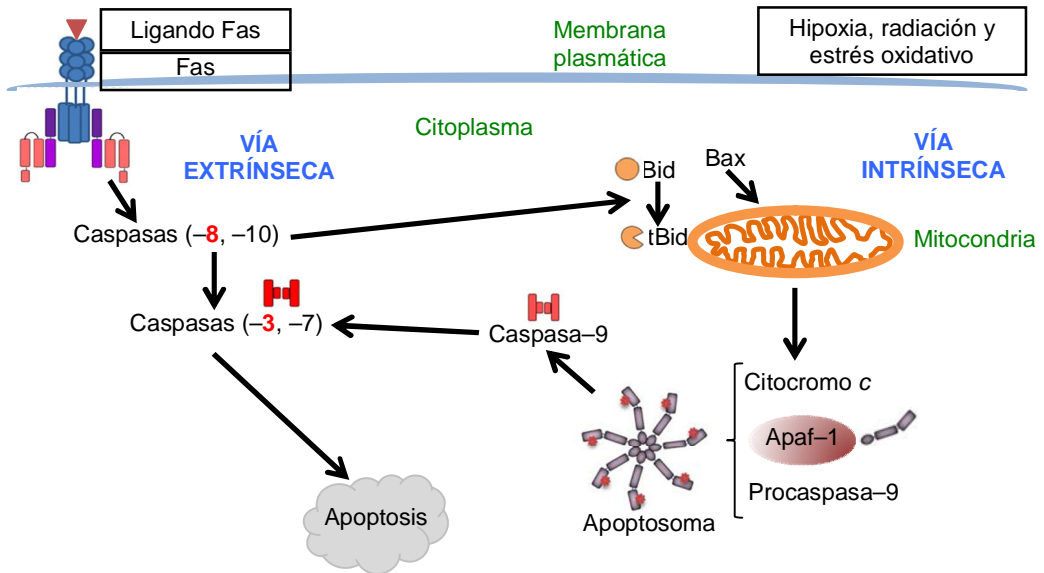


Figura 3. Vías extrínseca e intrínseca de muerte por apoptosis. La caspasa-8, en respuesta a la unión de señales de muerte (ligando Fas), es la principal iniciadora de la vía extrínseca y activa a las caspasas efectoras-3 y -7, siendo la caspasa-3 la principal implicada en la muerte por apoptosis. La vía intrínseca se activa por estímulos externos que producen daño mitocondrial, induciendo la activación de factores pro-apoptóticos, liberándose el citocromo c, que a su vez se une a Apaf-1 y a la procaspasa-9 generando el apoptosoma. Éste último activa a la caspasa iniciadora (caspasa-9) que a su vez activa a las caspasas efectoras-3 y -7 dando lugar a la muerte por apoptosis.

1.7 Ciclo celular

El ciclo celular presenta una duración variable en función del tipo celular. En el caso de los mamíferos las células se duplican cada 24 h. En el ciclo celular se distinguen varias fases, destacando entre ellas la mitosis, momento en el que tiene lugar la división celular. Durante la mitosis se produce la descomposición de la envoltura del núcleo, se forman cromosomas visibles tras la condensación del contenido nuclear y se forma el huso mitótico con la reorganización de los microtúbulos, para finalmente, separar los cromosomas. Durante la mitosis los cromosomas se alinean en el huso mitótico, antes de su segregación en una fase conocida como la metafase. La separación de los

cromosomas duplicados indica el inicio de la anafase, en la que estos cromosomas se trasladan a los diferentes polos de la célula, donde se descondensan formando los nuevos núcleos. Seguidamente tiene lugar la citocinesis, proceso final de la mitosis (fase M del ciclo celular), en la que la célula se divide en dos por su zona central. La fase M tiene una duración aproximada de 1 h y representa una pequeña parte de todo el ciclo celular. Los períodos que tienen lugar entre la fase M y la siguiente fase se denomina interfase y comprende un período de tiempo más largo, en el que se producen procesos de preparación para la división celular en una secuencia muy ordenada. En concreto, durante la interfase se produce la replicación del ADN nuclear. Una célula eucariota típica presenta las cuatro fases sucesivas del ciclo celular (Figura 4): (i) fase G_1 : la célula se prepara para la síntesis del ADN, (ii) fase S: conocida como la fase de síntesis del ADN, en la que se duplica el ADN, (iii) fase G_2 : la célula aumenta de tamaño y se prepara para la mitosis y (iv) fase M: la célula entra en mitosis, dividiéndose en dos células hijas.

Si las condiciones extracelulares son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase G_1 e incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado G_0 , en el que pueden permanecer días, semanas o incluso años antes de volver a proliferar. Muchas células se mantienen en G_0 hasta que ellas o el organismo mueren. Cuando las condiciones extracelulares son favorables y hay señales para crecer y dividirse, las células en G_0 progresan a través de un punto de determinación próximo al final de G_1 denominado punto de restricción en células de mamíferos [3]. En seres humanos la mayoría de las células se encuentran en esta fase.

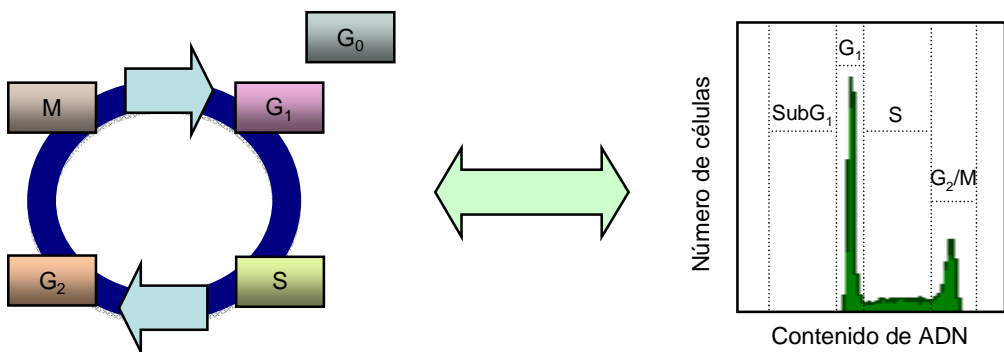


Figura 4. Fases del ciclo celular.

1.8 Inhibición de la proliferación celular

Las células eucariotas presentan un esqueleto interno que les confiere su forma, su capacidad de moverse y de distribuir sus orgánulos y de transportarlos de una parte a la otra de la célula. El citoesqueleto está formado por una red de filamentos proteicos entre los que se encuentran los filamentos de actina y los microtúbulos. Estos filamentos son imprescindibles en los movimientos internos que tienen lugar en el citoplasma de las células. En concreto, los microtúbulos del huso mitótico son esenciales en la distribución del ADN en dos partes iguales de dos células hijas cuando una célula se divide. Dado su papel en la mitosis los microtúbulos se han convertido en una diana atractiva en el desarrollo de fármacos antitumorales despolimerizantes (vincristina, vinorelbina y estramustina fosfato) y polimerizantes (paclitaxel y docetaxel), que inhiben la dinámica de los microtúbulos, provocando la rotura del huso mitótico y dando lugar a la parada del ciclo celular en la fase de mitosis.

Las proteínas quinasas presentes en las células eucariotas tienen funciones como la transmisión de señales extracelulares al interior de la célula y dirigir el ciclo celular. Entre estas proteínas destacan las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que son componentes centrales en el proceso de división celular. Una proteína quinasa dependiente de ciclina sólo es activa cuando se une a otra proteína llamada ciclina, se fosforila la cadena lateral de un determinado residuo de Thr y se desfosforila un residuo de una determinada fosfotirosina. De esta manera la CDK integra un conjunto de componentes celulares (ciclina, proteína quinasa y proteína fosfatasa), que se activa cuando estos componentes se encuentran en su estado de actividad adecuado. Los niveles de CDK se mantienen estables en las células, en cambio las ciclinas se sintetizan y se degradan sucesivamente, mientras la célula atraviesa las diferentes fases de su ciclo celular, y con el aumento y la disminución de los niveles de ciclinas se activan sus CDKs correspondientes. En la transición de la fase G_1 a la fase S se expresan altas concentraciones de ciclinas D (D1, D2 y D3) [64]. Para la correcta ejecución de la fase tardía de S y G_2/M se activan otros complejos CDK–ciclina, CDK2/ciclina E, CDK2/ciclina A, CDK1/ciclina A and CDK1/ciclina B [65]. Además la actividad de las CDK puede ser regulada por las proteínas inhibidoras del ciclo celular (CKI), ya que se unen a las

proteínas CDK y/o al complejo CDK/ciclina, impidiendo su actividad y frenando el desarrollo de la secuencia del ciclo celular [66,67].

Existen unos puntos de control en cada fase del ciclo celular, que se encargan de detener el ciclo celular cuando se produce un daño o fallo en el ADN, para que se puedan desarrollar los mecanismos de reparación. Si esta reparación no se produce, las células se eliminan por apoptosis. Se ha observado que los puntos de control situados entre las fases G_1 y S y en G_2/M , son perturbados por flavonoides como la genisteína, la daidzeína, el kaempferol, etc, [68,69], induciendo muerte celular por apoptosis. Las células tumorales se caracterizan por presentar un ciclo celular desregulado, contribuyendo a una proliferación descontrolada. Alteraciones y desregulaciones de la actividad de CDKs son indicadores de la existencia de neoplasia. Algunos cánceres están relacionados con mutaciones de los genes de CDK o de los inhibidores de CDK. Por este motivo es interesante desarrollar nuevos agentes anticancerígenos que actúen modulando las proteínas reguladoras del ciclo celular como hacen la quercetina, la daidzeína y la silimarina.

1.9 Especies reactivas de oxígeno

El metabolismo del oxígeno consumido por un organismo da lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS), que en su mayoría se producen en la mitocondria. Un problema en el equilibrio celular de oxidación–reducción (redox), puede producir un aumento de radicales de oxígeno altamente reactivos, impidiendo la homeostasis redox y las funciones celulares, dando lugar a la muerte celular [70,71]. Una serie de aminoácidos, con un grupo tiol, que les confiere una gran reactividad, juegan un papel importante en el equilibrio redox. Entre ellos se encuentran la cisteína, la metionina, la homocisteína y la taurina, estando más involucrados los dos primeros en el metabolismo celular de los mamíferos. El glutatión (γ -Glu-Cys-Gly) es un tripéptido con un grupo tiol, que abunda en las células en su forma reducida y se considera el principal antioxidante [72]. Una disfunción de la síntesis de glutatión a nivel cerebral da lugar a enfermedades neurodegenerativas.

1.10 Proteínas quinasas activadas por mitógenos

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) pertenecen a la familia de las serina/treonina quinasas y son las responsables de la transducción de la respuesta intracelular frente a varios estímulos. Incluyen tres grupos principales: (i) las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), (ii) las proteínas quinasas activadas por estrés (JNK/SAPK) y (iii) las proteínas quinasas activadas por mitógenos (p38^{MAPK}).

Las MAPKs están implicadas en el control de las vías de transducción de señales, por medio de fosforilaciones en cascada y regulan funciones celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La vía de señalización en cascada consiste en la fosforilación en serie de diversas proteínas. Las MAPKs se activan por la acción de las proteínas de la familia de las MAPKK (MEK, MKK o MAPKK), que a su vez son activadas por las MAP quinasas quinasas quinasas (MAPKKK, MKKK o MEKK) entre los que destaca el proto-oncogen c-Raf (Figura 5). La especificidad de MEK por las MAPKs depende del contexto. Todas las MEK ejecutan su fosforilación dual en el motivo con secuencia de aminoácidos Thr-X-Tyr, donde X confiere la especificidad. Para las ERK X es el ácido glutámico, para JNK/SAPK es la prolina y la glicina para las p38. La actividad de MEKs se controla por la fosforilación, siendo enzimáticamente activas las MEKs fosforiladas. El estado de la fosforilación se encuentra bajo el control de las MAP quinasas quinasas quinasas [73].

La vía de señalización en cascada de ERK promueve la proliferación y la supervivencia celular, mientras que las vías de señalización de p38 y JNK juegan un papel pro-apoptótico. El equilibrio dinámico entre los efectos opuestos de ERK y JNK/p38 influye en el destino de la célula [74], ya que la respuesta celular frente a compuestos inductores de apoptosis se asocia a la inactivación de las quinasas de supervivencia y a la activación de las quinasas apoptóticas [75].

Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos

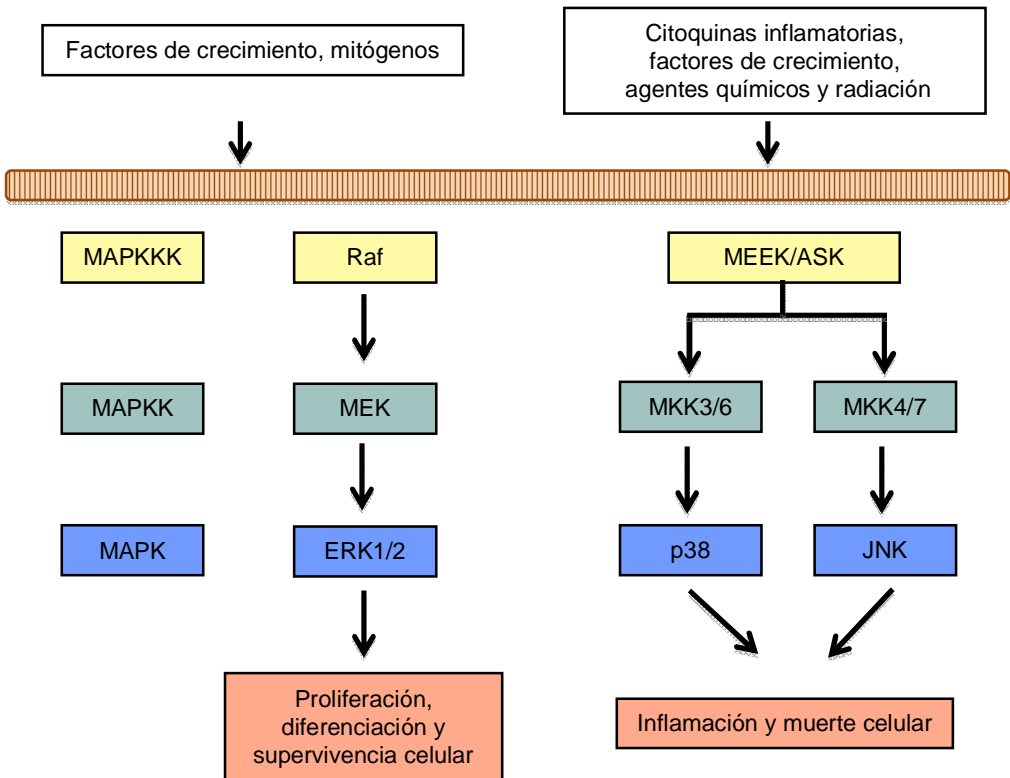


Figura 5. Vía de activación de las MAPKs.

La primera cascada de MAPKs caracterizada fue la vía de señalización de ERK. Hay dos isoformas de ERK (ERK1 y ERK2) conocidas como p42 y p44 respectivamente. En la activación en cascada del complejo (Raf–MEK–ERK), las quinasas MEK presentan una especificidad dual con la capacidad de fosforilar tanto residuos de serina/treonina como los residuos de tirosina. La proteína serina/treonina Raf es la responsable de la fosforilación y la activación de MEK, que a su vez es activada por la enzima GTPasa. Este conjunto de proteínas transmiten diversos estímulos al núcleo celular, contribuyendo cada una a la proliferación de las células. Se atribuye a ERK1/2 una gran importancia en la regulación de la proteína AP–1, perteneciente a la familia de los factores de transcripción.

La proteína quinasa p38 existe en cuatro isoformas α , β , γ y δ . A pesar de que cada una de estas isoformas es ligeramente diferente en cuanto a su estructura y su secuencia,

sus lazos de activación contienen la secuencia TGY. La proteína quinasa p38 se activa selectivamente por dos isoformas de MEK (MEK3 y MEK6); MEK3 activa solamente a las isoformas p38 α y p38 β y MEK6 tiene la capacidad de fosforilar todas las isoformas de las p38. Los estímulos extracelulares de la vía de p38 incluyen una variedad de citoquinas (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, TGF- β y TNF- α), además de la acción de factores ambientales como el choque térmico, cambios osmóticos, radiación UV, radicales de oxígeno y estados de hipoxia. La activación de p38 puede producirse por otras quinasas o por factores de transcripción como ATF-2 y MEF2. Concretamente ATF-2 puede formar heterodímeros con otros factores de transcripción como Jun que están asociados con AP-1. La familia de las quinasas JNK/SAPK está formada por tres miembros (JNK1, JNK2 y JNK3), que a su vez se activan por dos MAPKs (MKK4/SEK1 y MKK7). Al igual que ERK1/2, JNK se considera esencial en la activación de la familia de proteínas AP-1. Las proteínas MAPKK que activan a JNK son MKK7 (activada por las citoquinas TNF y IL-1) y MKK4 (activadas por estrés ambiental). Se requiere una actividad basal de MKK4 para la activación completa de JNK por parte de TNF a través de MKK7. Las proteínas MAPKKK que intervienen en la activación de JNK, pertenecen a un grupo de 12 proteínas intracelulares entre las que se encuentran las MEKK (1-4). La duración y amplitud de la activación de JNK viene determinado por el equilibrio entre estímulos externos y los mecanismos de inactivación interna. En general cada mediador de la fosforilación de JNK/SAPK, se activa en respuesta a distintos estímulos, incluyendo citoquinas inflamatorias (TNF α y IL-1 β), radiación UV, especies reactivas de oxígeno, calor, choque osmótico y por la ausencia de factores de crecimiento [76].

La existencia de inhibidores farmacológicos de las MAPKs ha permitido estudiar las consecuencias fisiológicas de la señalización de estas proteínas quinasas. La mayoría de los inhibidores de proteínas quinasas son moléculas pequeñas que interfieren en la fosforilación o se unen en la zona de unión del ATP, donde se encuentra el lazo de la activación de las MAPKs, en el que tiene lugar la fosforilación dual. Los inhibidores PD98059 y U0126 bloquean la fosforilación de MEK1, inhibiendo la activación de ERK1/2. El inhibidor específico de JNK2, denominado SP600125, no interfiere en la vía de las quinasas ERK y p38 y se utiliza de manera generalizada en el estudio de las quinasas JNK. En el caso de p38, se utiliza el inhibidor SB203580.

OBJETIVOS

1. Determinar la actividad citotóxica de un grupo de flavonoides sintéticos en varias líneas de células leucémicas humanas.
2. Identificar los compuestos más citotóxicos, establecer sus relaciones estructura–actividad y estudiar el mecanismo de acción del más potente.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Agentes farmacológicos

Los estudios correspondientes a la síntesis, purificación y elucidación estructural de los compuestos sintéticos (Figura 6) se llevaron a cabo en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC, La Laguna, Tenerife, bajo la dirección del Dr. Ignacio Brouard.

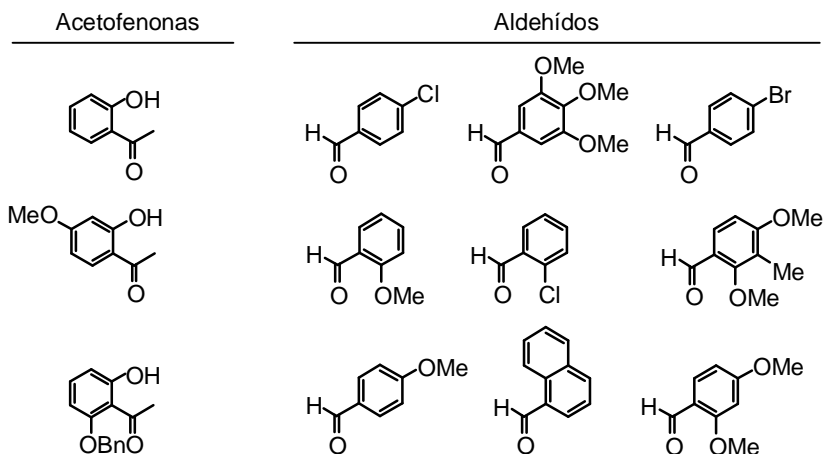
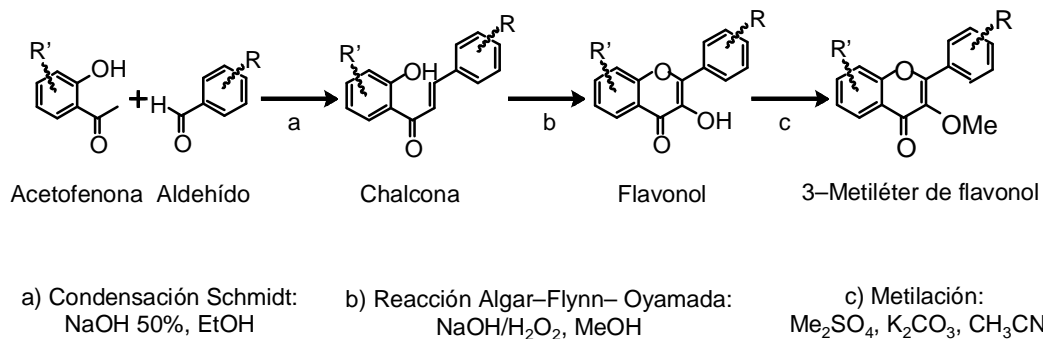


Figura 6. Síntesis de flavonoides. Se presentan parte de las acetofenonas y de los aldehídos utilizados. El compuesto **72** se sintetizó a partir de quercetina por una reacción de metilación parcial.

3.2 Reactivos

El agua destilada y bidestilada se obtuvo a partir de un equipo Mili-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica, Madrid, España). El docedil sulfato sódico (SDS) se obtuvo de Bio-Rad. El cloruro de sodio, trizma base, sacarosa, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, Tween 20, trizma base, trizma-HCl, EDTA, EGTA y otros reactivos utilizados en la elaboración de tampones se obtuvieron de Sigma Chemical Co. o de BDH (Carlo Erba, E Merck y Fluka). Las botellas de cultivo de 75 cm², los tubos falcon de 15 mL y 50 mL, las placas de cultivo celular de 60 mm y 100 mm, los tubos eppendorf de 0,5 mL y de 1,5 mL, las puntas de pipeta de 10 µL, 200 µL y 1.000 µL, las pipetas de 5 mL y 10 mL, las placas de cultivo de 24 y 96 pocillos y el resto del material estéril utilizado se adquirieron de Becton-Dickinson. El medio de cultivo RPMI 1640, el suero bovino fetal (FBS), el HEPES [N-(2-hidroxiethyl) piperazino N'-(2-etanosulfónico)], el bicarbonato sódico, la L-glutamina, el azul de tripán, los antibióticos (estreptomycin, gentamicina y penicilina G), se adquirieron de Sigma Chemical Co. (San Luis, EE. UU.).

La proteinasa K, el fenol, la RNasa A, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la bisbencimida (Hoechst nº 33258), el yoduro de propidio y el paraformaldehído se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La agarosa se adquirió de Bio-Rad (Madrid, España) y el bromuro de etidio de Sigma/Aldrich (España). El cloroformo y alcohol isoamílico se obtuvieron de BDH (Poole, Inglaterra). Los fluorocromos H₂-DCF-DA (diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína) y JC-1 (yoduro de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetil-bencimidazolo-carbocianina) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA). Los antioxidantes trolox, N-acetil-L-cisteína (NAC) y tocoferol (vitamina E) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. La pepstatina A (inhibidor potente de proteasas ácidas), la aprotinina (inhibidor de serín proteasas que inhibe plasmina, tripsina y quimotripsina), leupeptina (inhibidor de cisteín y serín proteasas, plasmina, tripsina y papaína), ortovanadato sódico (inhibidor de fosfatasa alcalinas), ditiotreitól (DTT: reductor estéreo-selectivo de puentes disulfuro en complejos moleculares), PMSF (inhibidor de cisteín y serín proteasas y acetilcolinesterasa) y el detergente tritón X-100 fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Los sustratos específicos utilizados para determinar la actividad de caspasa-3/-7 DEVD-pNA (*N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina), caspasa-6 VEID-CHO (*N*-acetil-Val-Glu-Ile-Asp-*p*NA), caspasa-8 IETD-pNA (*N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina) y caspasa-9 LEHD-pNA (*N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina) fueron obtenidos de Sigma. La paranitroanilina (pNA) fue obtenida de Calbiochem. El inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk [benciloxi-carbonil-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoro-metilcetona] y los inhibidores específicos de caspasas z-DEVD-fmk [benciloxicarbonil-Asp-Glu-Val-Asp (OMe)-fluoro-metilcetona], z-LEHD-fmk [benciloxicarbonil-Leu-Glu-His-Asp (OMe)-fluoro-metilcetona], z-IETD-fmk [benciloxicarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp (OMe)-fluoro-metilcetona] y z-LEVD-fmk [benciloxicarbonil-Leu-Glu(OMe)-Val-Asp (OMe)-fluoro-metilcetona] se obtuvieron de Sigma Chemical Co. El inhibidor específico de caspasa VEID-CHO (Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Val-Glu-Ile-Asp-CHO) es de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Las membranas (PVDF) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvieron de Millipore (Billerica, MA, EE. UU.).

El β -mercaptoetanol, el azul de bromofenol y la albúmina de suero bovino se adquirieron de Sigma. Los marcadores de pesos moleculares, persulfato amónico, TEMED (*N,N,N,N*-tetrametil-etilendiamina), SDS (dodecil sulfato sódico) y la acrilamida (bis *N,N'*-metilen-bis-acrilamida) se obtuvieron de Bio-Rad. Las placas para autorradiografía se adquirieron de Kodak. Los anticuerpos de las caspasas-3, -7, -8, -9, fosfo-p38^{MAPK} (Thr180/Tyr182), p38^{MAPK}, fosfo-JNK (Thr183/Tyr185), fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y ERK1/2 se obtuvieron de Cell Signaling Technology. De Medical and Biological Laboratories Co fueron obtenidos los anticuerpos de las caspasas-4 y -6. Los anticuerpos de Smac/DIABLO, Bid y Bax se adquirieron de BD Biosciences. El anticuerpo de Bcl-2 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos de β -actina y α -tubulina fueron adquiridos de Sigma/Aldrich. De Amersham Biosciences se adquirieron los anticuerpos secundarios. Los inhibidores específicos de MAPKs (SP600125, PD98059, SB203580, U0126) se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

3.3 Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó contando las células en un hematocitómetro y utilizando el método de exclusión del azul de tripán (0,025%), obteniéndose una viabilidad superior al 95% al inicio de los experimentos [77].

3.4 Cultivos celulares

3.4.1 Cultivo de células de leucemia mieloide humana HL–60, U937 y K562 y de células de leucemia linfoide humana Molt–3

Las células HL–60, U937, K562 y Molt–3 se adquirieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Braunschweig, Alemania) y fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomicina) y 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y en una atmósfera húmeda (37°C y 5% CO₂) [78]. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana con una cadencia aproximada de 48 h y las células se dividieron aproximadamente cada 24 h. La densidad celular no superó las 500.000 células/mL.

3.4.2 Cultivo de células U937/Bcl–2, que sobreexpresan el gen humano Bcl–2

La Dra. Jacqueline Bréard (INSERM U749, Faculté de Pharmacie Paris–Sud, Châtenay–Malabry, Francia) proporcionó las células U937/Bcl–2. Esta línea celular se cultivó en RPMI 1640 suplementado con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomicina) y 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y en una atmósfera húmeda (37°C y 5% CO₂), manteniendo una densidad celular inferior a 500.000 células/mL. Las células se duplicaron cada 24 h y el medio de cultivo se cambió cada 48 h aproximadamente.

3.4.3 Cultivo de células K562/ADR

La línea celular K562/ADR resistente a la doxorubicina fue proporcionada por la Dra. Lisa Oliver (INSERM, Nantes, Francia). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomicina),

10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y 200 ng/mL de doxorubicina en una atmósfera húmeda (37°C y 5% CO₂). Las células presentaron una tasa de duplicación de 24 h aproximadamente y el medio se cambió cada 48 h.

3.5 Tratamiento con los compuestos

Los compuestos a evaluar se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 25 mM y se almacenaron a 25°C en oscuridad. En el momento de la realización de los experimentos se disolvieron en medio de cultivo a 37°C. El porcentaje de DMSO no superó el 0,3%. De esta manera se evitaron concentraciones de DMSO tóxicas para las células. Las células control se trataron con el mismo porcentaje de DMSO que el establecido para los tratamientos.

3.6 Evaluación de la citotoxicidad

Los experimentos se realizaron con el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la actividad deshidrogenasa mitocondrial [79]. Se cultivaron las células en placas de 96 pocitos, en un volumen final 200 µL de medio de cultivo, a una densidad de 10.000 células/pocito, en presencia de concentraciones crecientes de los flavonoides, durante 72 h. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las placas se centrifugaron a 500 g durante 10 min a 25°C. Finalizada la centrifugación se aspiró el medio cuidadosamente y en oscuridad se añadieron 100 µL de la disolución de MTT (0,5 mg/mL) a cada pocillo, preparada en medio RPMI con antibióticos a 37°C. Las placas se incubaron durante 4 h en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂. La reacción se paró añadiendo 100 µL de SDS (20%) con HCl 0,02 N e incubando la mezcla hasta la mañana siguiente. Para la cuantificación de la conversión del MTT (amarillo) en su forma reducida (púrpura) se utilizó un lector de microplacas (modelo 680 Bio-Rad) a una longitud de onda de 570 nm. Se usaron como blancos los pocitos vacíos a los que también se les añadió 100 µL de la disolución de MTT. El análisis de datos se realizó con el programa informático Prism 4.0 (GraphPad), determinándose la concentración del producto requerida para reducir la viabilidad celular al 50% de su valor máximo (IC₅₀).

3.7 Evaluación de la fragmentación del ADN

Es un método cualitativo, basado en la detección de la fragmentación internucleosómica del ADN y su visualización como una escalera discontinua de bandas multiméricas de 185–200 pares de bases, características del proceso de muerte celular por apoptosis. Las células ($\sim 1 \times 10^6$ /mL) se recolectaron mediante centrifugación a 12.000 g durante 1 min a 4°C y se lavaron dos veces con PBS a 4°C. Se resuspendieron con 30 μ L de tampón de lisis [50 mM Tris–HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,5% SDS] y se incubaron sucesivamente con 1 μ g/ μ L de RNasa A durante 1 hora a 37 °C y con 1 μ g/ μ L de Proteinasa K durante 1 h a 50 °C. Seguidamente a cada muestra se añadieron 2 μ L de azul bromofenol (0,25% en agua) y se extrajo el ADN con 100 μ L de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 1 min a 25°C. Se separó la fase acuosa de color azul, se lavó con 100 μ L de cloroformo y se añadió 5 μ L de tampón de carga [10 mM EDTA (pH 8,0) con 1% (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión y 40% de sacarosa] y se incubó a 70°C durante 5–10 min. Se preparó un gel de agarosa al 1,8% donde se cargaron 30 μ L de cada muestra, que se sometieron a electroforesis (5 V/cm) durante 3–4 h. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron los geles con bromuro de etidio (1 μ g/mL) durante 20 min [75]. Se visualizaron los fragmentos de ADN a una longitud de onda de 260 nm en un transiluminador. Las imágenes se capturaron con una cámara digital (DC290, Kodak).

3.8 Evaluación de la morfología nuclear mediante tinción con el fluorocromo trihidrocloruro de bisbencimida

Es un método cuantitativo, con el que se pueden observar cambios morfológicos del núcleo, como la condensación y la compactación en la zona periférica nuclear de la cromatina y la segmentación del núcleo, gracias a la capacidad del fluorocromo bisbencimida (Hoechst 33258) para unirse al ADN. Las células ($\sim 5 \times 10^5$ /mL) se lavaron con PBS [10 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl (pH 7,4)] y se fijaron con 70 μ L de una disolución de de paraformaldehído preparada al 3% en PBS, durante 10 min a 25°C. Seguidamente se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 1 min y se aspiró el paraformaldehído. Las muestras se tiñeron, en oscuridad, con 20 μ L de una disolución

de bisbencimida (Hoechst 33258) en PBS (20 µg/mL), durante 15 minutos a 25°C. La morfología nuclear se analizó con un microscopio de fluorescencia (Zeiss–Axiovert). Las células apoptóticas presentaron condensación de la cromatina, compactación de la misma a lo largo de la periferia del núcleo y/o la fragmentación nuclear [79].

3.9 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las células se centrifugaron a 500 g durante 10 min y posteriormente se resuspendieron con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,2) durante 24 horas para conseguir la fijación de las muestras. Se realizó una post-fijación en OsO₄ al 1% disuelto en tampón fosfato. Se utilizaron concentraciones crecientes de etanol para deshidratar las células. El sedimento se incluyó en resina EMBed 812 polimerizado a 70°C. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo Reichert Ultracut (Leica). Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y plomo y los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina. Las células se fotografiaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 910 (Carl ZEISS, Germany) equipado con cámara digital Proscan Slow-scan CCDCamera (Fa. Proscan Elektronische Systeme GmbH, Alemania) y software Soft Imaging System (Alemania) del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

3.10 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Es un método cuantitativo basado en la fluorescencia emitida por diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN, como el yoduro de propidio. Se puede detectar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en función de su contenido en ADN. El primer pico está formado por las células en fase G₁, en la fase S las células sintetizan ADN y el segundo pico representa las células en fase G₂/M (células con doble contenido de ADN). Las células apoptóticas son las que presentan ADN hipodiploide (menor contenido en ADN que una célula normal) y se localizan en la fracción SubG₁, a la izquierda del primer pico G₁. Las células se lavaron con PBS a 4°C y se fijaron durante una hora en etanol al 70%, a -20°C. Las muestras se lavaron dos veces con PBS a 25°C, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron en oscuridad con 200 µL de una disolución de yoduro de propidio (50 µg/mL) y RNasa (100 µg/mL) en PBS

[80]. Para medir el contenido en ADN se utilizó un citómetro BD FACSVerserTM y una longitud de onda de excitación de 488 nm y un máximo de emisión de 625 ± 15 nm.

3.11 Determinación de la actividad caspasa

Las células se colectaron por centrifugación a 1.000 g durante 5 min a 4 °C. Inmediatamente se lavaron con PBS a 4°C, en las mismas condiciones, y se resuspendieron en tampón de lisis [50 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM ditioneitol, 0,1 mM EDTA, 0,1% Chaps] durante 5 min en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se guardaron a -20°C. El método de Bradford se utilizó para determinar la cantidad de proteínas en los sobrenadantes. La determinación de la actividad caspasa, se realizó por duplicado en una placa de 96 pocillos. Aproximadamente 20 µg de proteínas de las fracciones citosólicas se incubaron con los siguientes sustratos colorimétricos específicos de cada caspasa: caspasa-3/-7 [DEVD-pNA, (*N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina)], caspasa-6 [VEID-pNA, (*N*-acetil-Val-Glu-Ile-Asp-pNA)], caspasa-8 [IETD-pNA, (*N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilina)] y caspasa-9 [LEHD-pNA, (*N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroanilina)] en tampón de lisis [50 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM ditioneitol, 0,1 mM EDTA, 0,1% Chaps] durante 24 h a 37°C. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas (modelo 680 Bio-Rad) a 405 nm y se usaron como blancos los pocillos que sólo contenían el sustrato específico para cada caspasa estudiada y el tampón de ensayo.

3.12 Inmunodetección de proteínas

Las células se recogieron y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4°C, y se lavaron dos veces con PBS a 4°C. Llegados a este punto, el procesamiento de las muestras varió en función del tipo de lisado celular (lisado celular total o fraccionamiento celular: núcleo, citosol y mitocondria). El precipitado celular obtenido se resuspendió en 100 µL de tampón de lisis [Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 10% glicerol, 137 mM cloruro sódico, 20 mM glicerofosfato de sodio, 1% Triton X-100, 2 mM de pirofosfato de sodio, 10 mM fluoruro sódico, 2 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, aprotinina (5 µg/mL), leupeptina (5 µg/mL), y pepstatina A (5 µg/mL)] y se incubó durante 15 min a 4°C. Los

lisados celulares se sonicaron cuatro veces, durante cinco segundos cada vez. Seguidamente se centrifugaron a 11.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se reservó para su análisis mientras que el precipitado, formado por membranas y restos celulares, se descartó.

El precipitado celular (10^7 células) se centrifugó y se resuspendió en 100 μ L de tampón isotónico [20 mM HEPES–KOH (pH 7,5), 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] con inhibidores de proteasas (0,1 mM PMSF, 10 μ g/mL aprotinina, 10 μ g/mL de leupeptina, y 10 μ g/mL pepstatina A), y se incubó durante 15 min a 4°C. Con una aguja de 21G se lisaron las células y seguidamente se centrifugó el extracto obtenido a 1.000 g durante 5 min a 4°C. La fracción nuclear contenida en el precipitado resultante se resuspendió en 100 μ L del tampón anterior y se sonicó 3 veces durante 10 s a 4°C. Paralelamente se centrifugó el sobrenadante obtenido a 22.000 g durante 20 min a 4°C. El precipitado resultado de esta última centrifugación (fracción mitocondrial) se resuspendió en 50 μ L del tampón anterior y el sobrenadante se usó como fracción citosólica. Todas las fracciones celulares se congelaron a –20°C hasta el momento de su utilización.

El método Bradford se usó para determinar la concentración de proteínas, ajustándose todas las muestras a la misma concentración usando el tampón anterior. Los lisados celulares se hirvieron en tampón de electroforesis [50 mM Tris–HCl (pH 6,8), 5 mM β -mercaptoetanol, 2 mM EDTA, 15% sacarosa, 3% SDS, y 0,01% azul de bromofenol] a 100°C durante 5 min. Una vez se enfriaron las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (del 7,5% al 15%, en función del peso molecular de la proteína en estudio), conteniendo 0,1% SDS y posteriormente transfiriéndose a membranas de PVDF durante 20 h. Las membranas se bloquearon con 10% de leche desnatada disuelta en tampón TBST [20 mM Tris–HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0,1% Tween–20] durante 1–2 h a 25°C. Seguidamente se incubaron las membranas con el anticuerpo específico, disuelto en TBST con un porcentaje de leche desnatada (1–5%) dependiente de los requisitos de cada anticuerpo a 4°C, en agitación suave durante 24 h. Las membranas se lavaron con TBST tres veces, durante 20 min cada vez, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a 25°C. Finalmente las membranas se lavaron con TBST en las mismas condiciones anteriores. La detección de

las proteínas específicas se realizó añadiendo a las membranas una disolución quimioluminiscente, usando un kit comercial (Millipore) y se expusieron las membranas a películas de autorradiografía (Kodak) durante el tiempo necesario para obtener una imagen nítida de las proteínas en estudio. Las películas se revelaron con un equipo revelador AGFA (Curix 60) en condiciones de oscuridad. Las imágenes se capturaron con un escáner y se analizaron con el programa Adobe Photoshop 7.0. Dos anticuerpos específicos (α -tubulina y β -actina) se utilizaron como control para verificar que se cargó la misma cantidad de proteínas en el gel.

3.13 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS)

La generación intracelular de especies reactivas de oxígeno se midió con un método fluorimétrico. Media hora antes de la finalización del tratamiento se añadió la sonda diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H_2 -DCFDA) ($8 \mu M$) a $37^\circ C$ [80]. A continuación, las células se recogieron y se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo con el equipo citómetro BD FACSVerserTM, excitando la sonda con un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm y recogiendo la emisión fluorescente de la diclorofluoresceína a una longitud de onda de 530 nm. Una mayor emisión de fluorescencia es indicativa de un aumento en la formación de ROS intracelular. Los resultados fueron analizados con el programa Flowing Software 2.

3.14 Métodos estadísticos

Cada grupo experimental se determinó por triplicado y las representaciones de los valores obtenidos corresponden a datos de dos o tres experimentos como mínimo (Media \pm S.E.M). El método de la t de Student o análisis de la varianza se utilizó para determinar la comparación entre los distintos tratamientos y se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 El flavonoide sintético 3',4'-dibenciloxiflavonol (compuesto 40) reduce la viabilidad de células de leucemia humana

Los flavonoides son un grupo de productos naturales polifenólicos, derivados del metabolismo secundario de las plantas [81], que poseen un amplio espectro de actividades biológicas, destacando aquellas relacionadas con el cáncer [20,82]. En la medicina tradicional los productos aislados de las plantas se utilizan de manera directa en el tratamiento de enfermedades, mientras que en los países desarrollados esta relación con los productos naturales es indirecta, debido a que el desarrollo de la tecnología permite diseñar y sintetizar nuevas entidades químicas a partir de compuestos naturales con una actividad definida [83].

En este trabajo se evaluó la actividad citotóxica de 78 flavonoides sintéticos (Figura 7) utilizando como modelo de estudio las líneas celulares de leucemia humana HL-60, U937, Molt-3, U937/Bcl-2, K562 y K562/ADR. Las células de leucemia mieloide aguda HL-60 y U937 fueron utilizadas porque constituyen un modelo útil para estudiar la inhibición de la proliferación por agentes químicos, físicos y fisiológicos. La línea U937/Bcl-2 expresa elevados niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, asociada con la resistencia a la quimioterapia. El gen Bcl-2 codifica una proteína de 26 kDa localizada en la membrana mitocondrial, que prolonga la vida de la célula bloqueando la apoptosis, especialmente en el caso de neoplasias hematológicas [84]. La línea de células de leucemia linfocítica Molt-3 es sensible a la acción citotóxica de compuestos antitumorales y mantiene funcionales tanto la ruta intrínseca como la extrínseca [85]. En cambio, las células de leucemia mieloide crónica K562 son particularmente resistentes a la inducción de apoptosis desencadenada por varios agentes antitumorales como el 1- β -D citosina arabinósido, etopósido, paclitaxel y camptotecina [86]. Estas células presentan una translocación que afectan a los cromosomas 9 y 22, cuyo resultado es la expresión de niveles elevados de la proteína de fusión Bcr-Abl quinasa que está implicada en una vía que estimula la proliferación. Hay un gran interés en el descubrimiento de compuestos capaces de inhibir la multiresistencia a la quimioterapia que presentan las células K562/ADR, a menudo correlacionada con la expresión de niveles elevados de la glicoproteína P, una proteína de membrana que actúa como una bomba dependiente de ATP, expulsando de las células una amplia gama de moléculas pequeñas.

Para evaluar la citotoxicidad de la serie de compuestos sintéticos se incubaron las células durante 72 h con concentraciones crecientes de los flavonoides y la IC_{50} de cada compuesto (concentración del producto requerida para reducir la viabilidad celular al 50% de su valor máximo) [80] se determinó por el método colorimétrico MTT, descrito en la sección de Material y Métodos. Entre los compuestos ensayados se realizó una comparación entre flavonoles y derivados 3–metiléter, ya que trabajos previos han puesto de manifiesto que estos últimos son más potentes [87]. Las chalconas se evaluaron porque se ha descrito que también poseen actividad citotóxica y son productos intermedios en la síntesis de los flavonoides.

Los valores de IC_{50} presentados en la Tabla 1 permitieron destacar las siguientes chalconas: 4–fluoro–2'–benciloxi–6'–hidroxichalcona **9**, 4–cloro–2'–benciloxi–6'–hidroxichalcona **10**, 4–bromo–2'–benciloxi–6'–hidroxichalcona **11**, 4–(2–piridil)–2'–benciloxi–6'–hidroxichalcona **13**, 4–trifluorometil–2'–benciloxi–6'–hidroxichalcona **15** y los flavonoles, 4'–cloroflavonol **27**, 4'–bromoflavonol **28**, 4'–trifluorometilflavonol **32**, 3',4'–dibenciloxiflavonol **40** y 5–benciloxi–4'–morfolinoflavonol **47**. Estos compuestos tienen como factor común un sustituyente en el carbono 4 del anillo B. Los compuestos **9**, **10**, **11**, **13**, **27**, **32** y **40** mostraron una alta capacidad antiproliferativa ($IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$) en todas las líneas de leucemia. El compuesto **28** presentó un valor de $IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ en todas las líneas leucémicas, excepto en K562/ADR. El valor de la IC_{50} del compuesto **47** fue superior a $10 \mu\text{M}$ en las líneas celulares, Molt–3, K562 y K562/ADR. En el caso de las chalconas, las más potentes fueron aquellas que contenían un radical 2'–benciloxi y un sustituyente en posición 4, pudiendo ser: (i) un halógeno F **9**, Cl **10** y Br **11**, (ii) un radical α –piridilo **13**, presentando valores de $IC_{50} \approx 5 \mu\text{M}$ en todas las líneas ensayadas. La sustitución de los radicales anteriores en posición 4, por un radical trifluorometilo **15**, generó un compuesto con una actividad similar, menos en las líneas U937 y U937/Bcl–2. La sustitución del radical trifluorometilo en posición 4 por un radical benciloxi, así como la introducción de un radical benciloxi adicional en 3 generó dos compuestos inactivos **16** y **17**.

En el caso de los flavonoles, los compuestos más potentes se caracterizan por poseer: i) un único sustituyente en el anillo B; ii) dos únicos sustituyentes en el anillo B y iii) un único sustituyente en la posición 5 del anillo A y un único sustituyente en el anillo B.

En el primer grupo, dentro del grupo de flavonoles con un único sustituyente en el anillo B, los más potentes contienen un halógeno o un radical trifluorometilo en posición 4' del anillo B. La naturaleza del halógeno es importante en la citotoxicidad de los flavonoles y esta dependencia es clara en la línea HL-60 en la que la potencia sigue el orden Br > Cl > F. Esto pone de manifiesto que tanto el tamaño del halógeno (Br > Cl > F) como la electronegatividad (Br < Cl < F) son determinantes en la citotoxicidad. El flavonol que contiene Br **28** fue aproximadamente tres veces más citotóxico que el que presenta Cl **27** (2,7 vs. 7,2) y aproximadamente ocho veces más potente que el flavonol con F **26** (2,7 vs. 20,8). En la línea U937 no se observó esa dependencia de la naturaleza del halógeno. En cambio en la línea Molt-3 los flavonoles conteniendo 4'-Cl **27** (2,6 vs. 10,6) y 4'-F **26** (2,7 vs. 10,6) fueron aproximadamente 4 veces más potentes que el 4'-Br **28**. Dentro del primer grupo de compuestos más potentes, el flavonol con un grupo 4'-trifluorometilo en el anillo B **32** fue el que presentó una IC₅₀ más uniforme (≈4 μM) en las líneas HL-60, U937, Molt-3, U937/Bcl-2 y K562.

En el segundo grupo, de los flavonoles con dos únicos sustituyentes en el anillo B el compuesto más potente resultó ser el 3',4'-dibenciloxiflavonol **40**. La presencia de ambos sustituyentes y las posiciones 3' y 4' son determinantes en la actividad, ya que la sustitución de cualquiera de los radicales benciloxi por un radical 3'-metoxi **38** ó 4'-metoxi **39** conlleva a una pérdida notable de potencia. De la misma manera, la introducción de un radical benciloxi adicional en la posición 5 **49** también implica una disminución importante de la citotoxicidad. Del total de compuestos ensayados el compuesto **40** fue el más potente con valores de IC₅₀~ 1 μM en las líneas HL-60, U937, Molt-3 y U937/Bcl-2 y valores de IC₅₀~ 5 μM en las líneas K562 y K562/ADR (Tabla 1 y Figura 8). Estudios comparativos con el flavonoide natural quercetina (3,5,7,3',4'-pentametoxiflavona) pusieron de manifiesto que el flavonol **40** es unas 80 veces más potente en la línea HL-60 [88]. El tratamiento con este compuesto indujo una inhibición de la proliferación celular dosis dependiente.

En el tercer grupo, dentro del grupo de flavonoles con un único sustituyente en la posición 5 del anillo A (un radical benciloxi) y un único sustituyente en el anillo B (compuestos **43**, **44**, **45**, **46** y **47**), el compuesto conteniendo un radical morfolino en la posición 4' del anillo B **47** fue el más potente, al menos en HL-60, U937 y U937/Bcl-2.

La introducción de los radicales 4'-fluor **43**, 4'-bromo **44**, 4'-metoxi **45** ó 4'- α -piridilo **46** generaron compuestos inactivos en todas las líneas ensayadas.

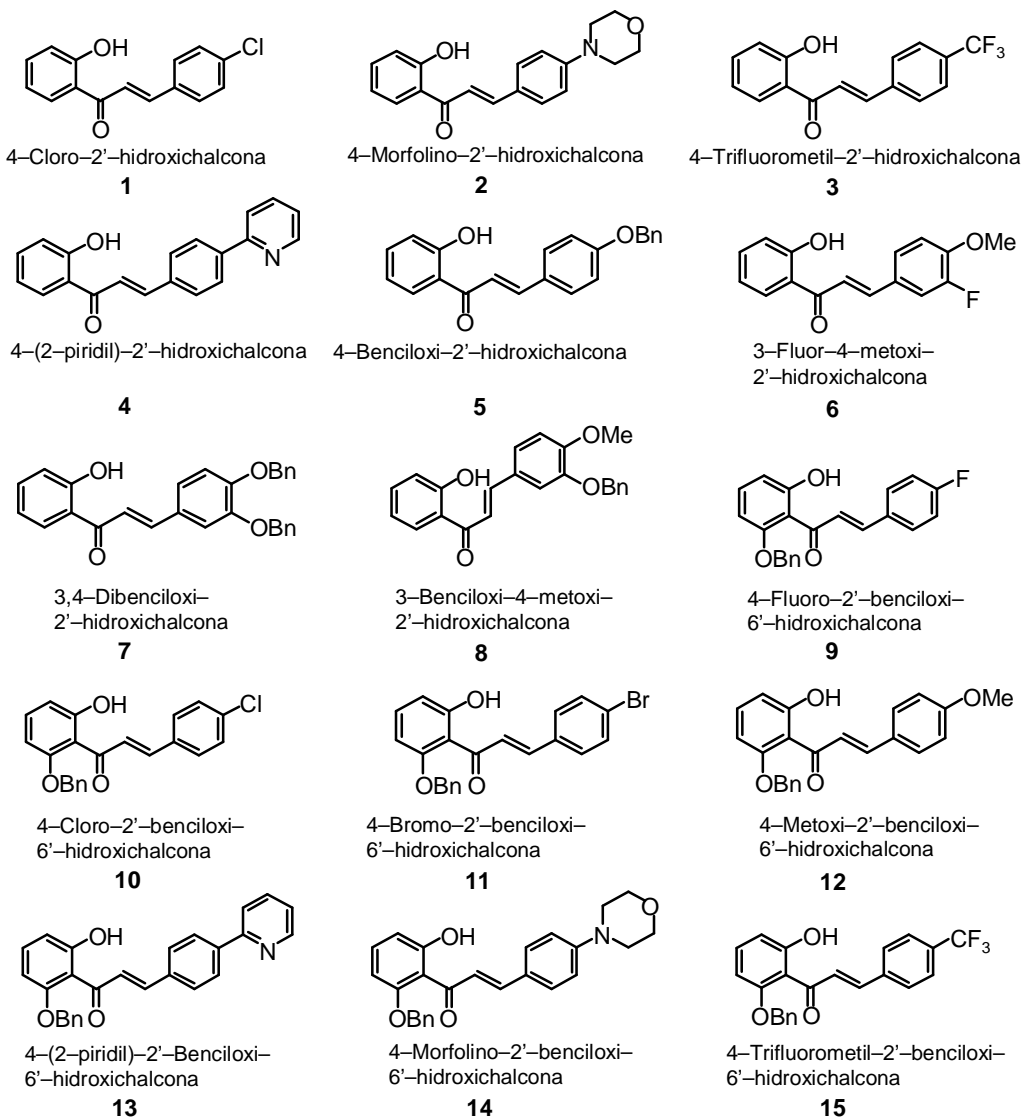
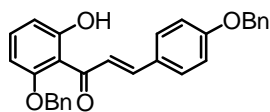
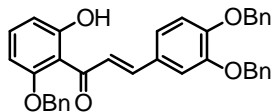


Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos analizados.



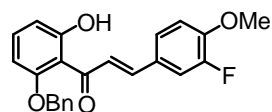
4,2'-Dibenciloxi-6'-hidroxichalcona

16



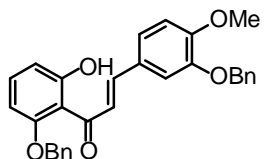
3,4,2'-Tribenciloxi-6'-hidroxichalcona

17



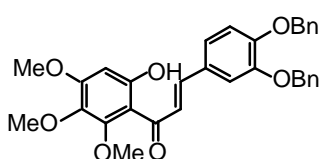
3-Fluoro-4-metoxi-2'-benciloxi-6'-hidroxichalcona

18



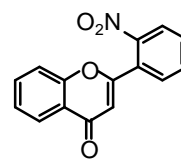
3,2'-Dibenciloxi-4-metoxi-6'-hidroxichalcona

19



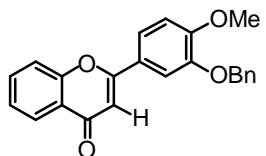
3,4-Dibenciloxi-2,3',4'-trimetoxi-6'-hidroxichalcona

20



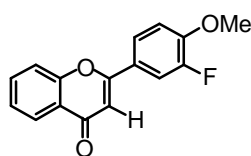
2'-Nitroflavona

21



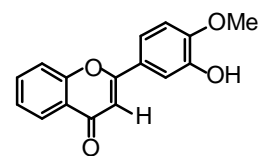
3'-Benciloxi-4'-metoxiflavona

22



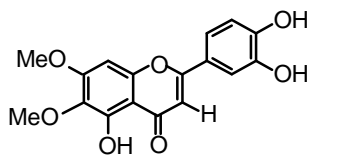
3'-Fluoro-4'-metoxiflavona

23



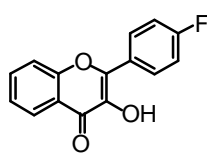
3'-Hidroxi-4'-metoxiflavona

24



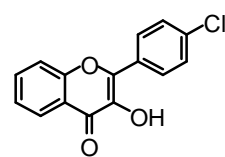
5,3',4'-Trihidroxi-6,7-dimetoxiflavona

25



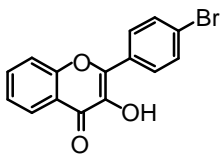
4'-Fluoroflavonol

26



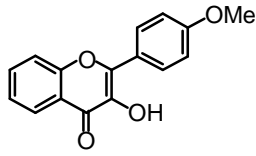
4'-Cloroflavonol

27



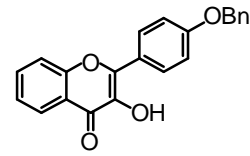
4'-Bromoflavonol

28



4'-Metoxiflavonol

29



4'-Benciloxiflavonol

30

Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos analizados (continuación).

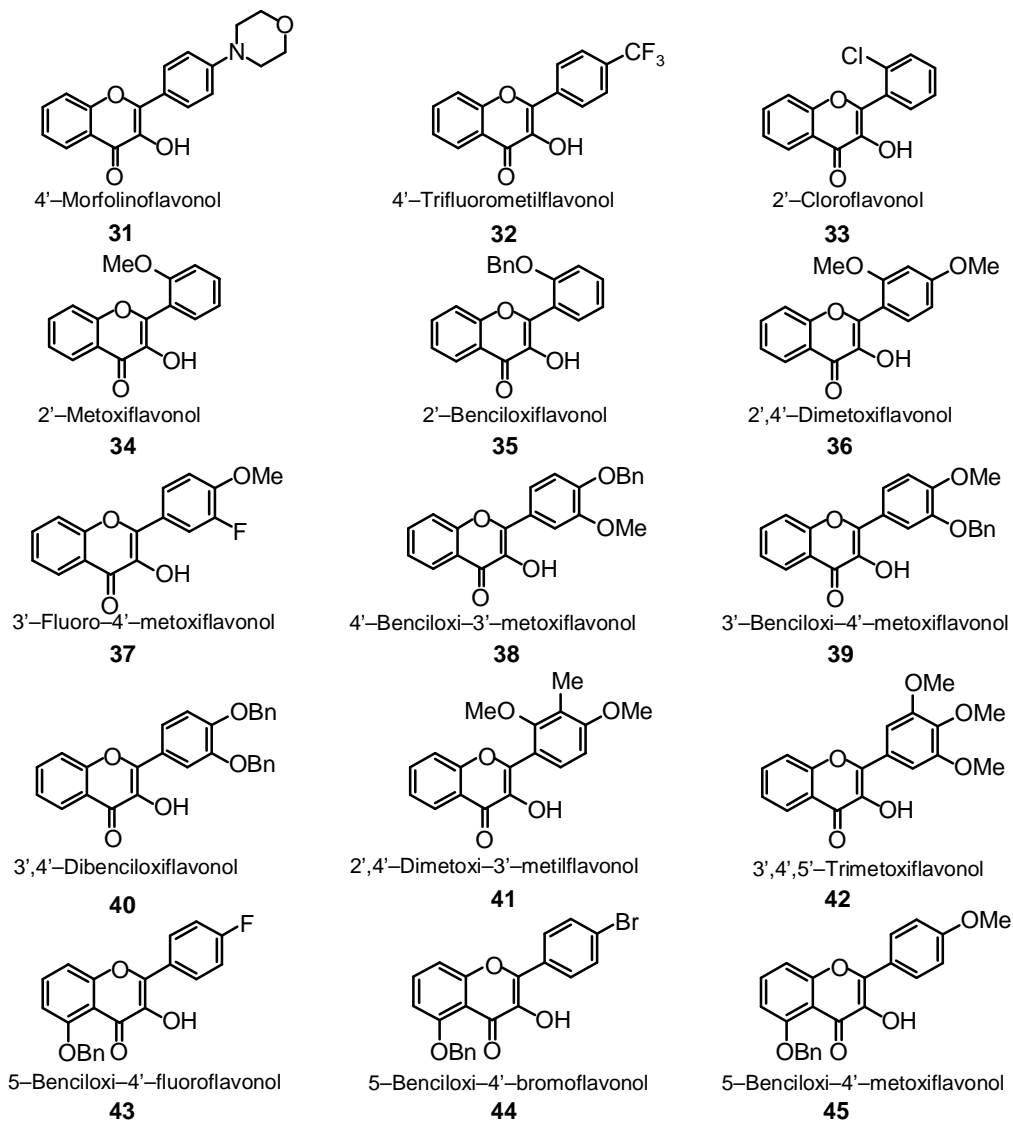


Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos analizados (continuación).

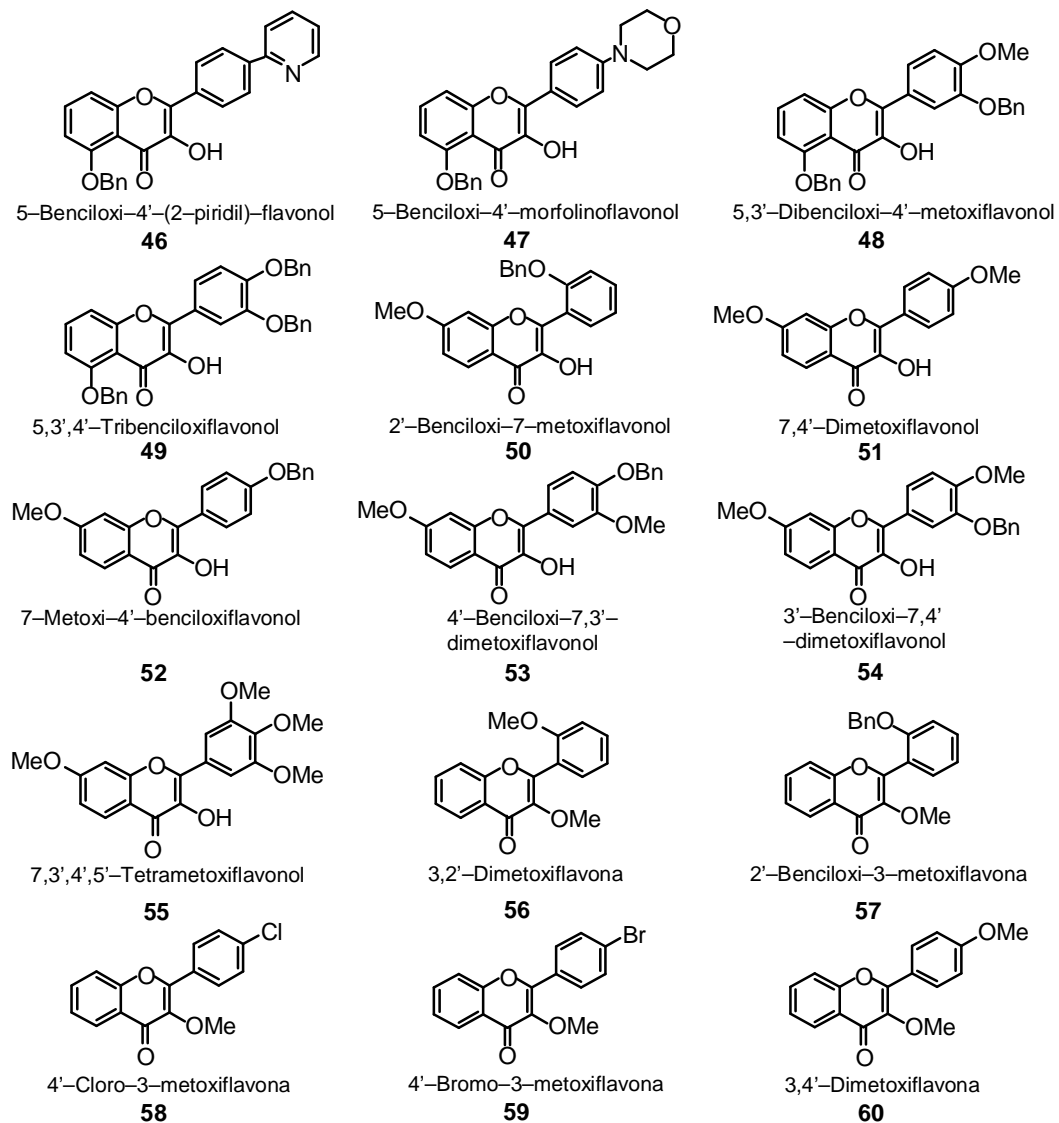


Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos analizados (continuación).

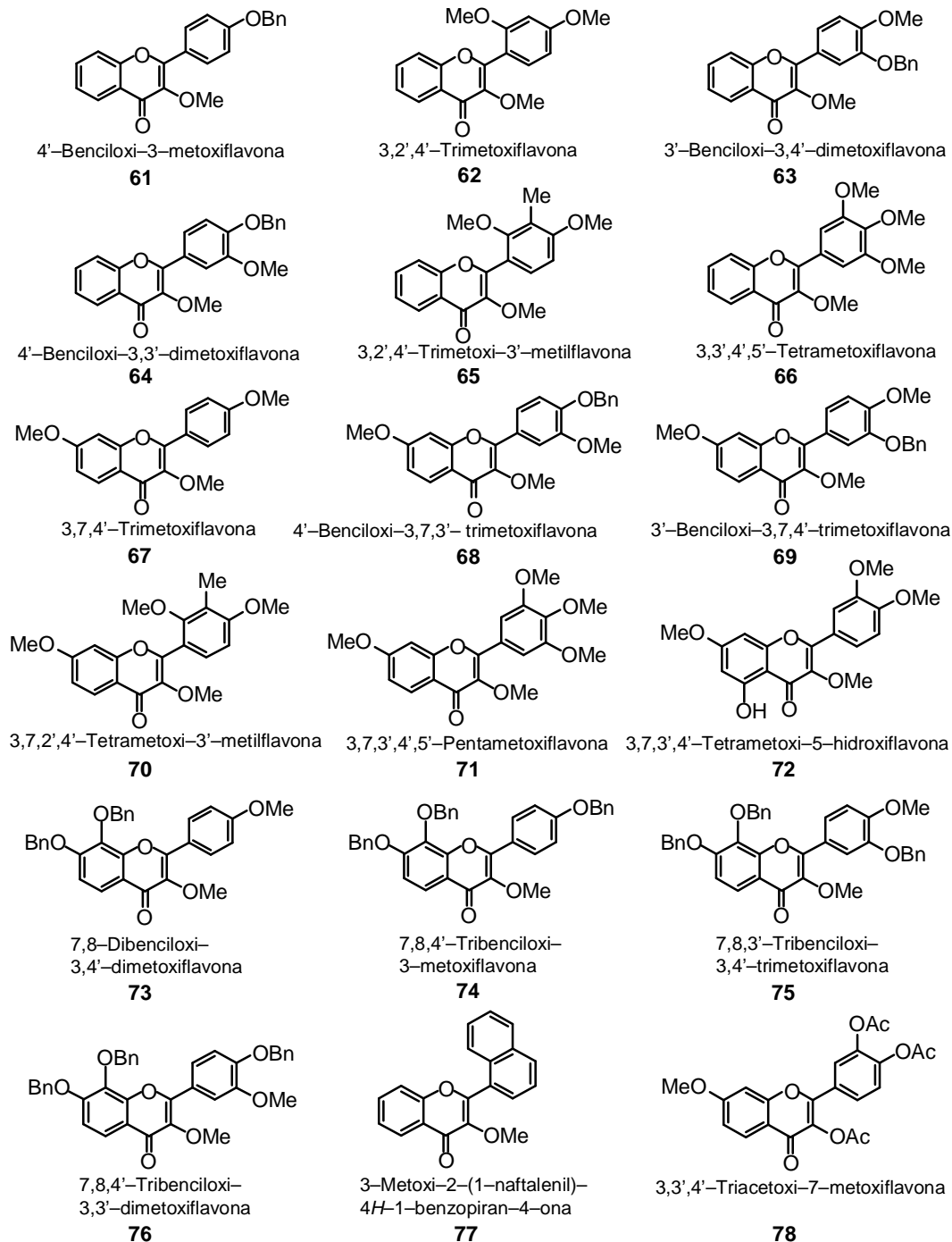


Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos analizados (continuación).

Tabla 1. Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las células de leucemia humana.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)					
	HL-60	U937	U937/Bcl-2	K562	K562/ADR	Molt-3
1	28,5 ± 0,7	4,5 ± 1,8	9,0 ± 4,6	28,0 ± 1,4	25,5 ± 0,9	16,3 ± 2,0
2	25,8 ± 0,3	26,8 ± 2,8	23,5 ± 6,0	29,8 ± 1,7	30,6 ± 3,7	23,8 ± 0,9
3	14,9 ± 6,8	4,6 ± 1,5	15,0 ± 2,4	25,5 ± 4,9	28,0 ± 3,0	15,4 ± 0,1
4	16,8 ± 1,6	10,3 ± 4,0	22,2 ± 4,7	19,5 ± 0,7	23,1 ± 2,2	10,7 ± 2,2
5	21,4 ± 4,0	23,7 ± 0,8	28,8 ± 6,4	43,0 ± 4,2	28,4 ± 1,5	20,3 ± 0,6
6	13,4 ± 2,8	23,5 ± 7,7	19,4 ± 3,7	25,0 ± 0,0	20,0 ± 1,4	16,1 ± 0,6
7	>100	41,2 ± 24,6	63,8 ± 7,4	76,0 ± 28,3	79,0 ± 25,5	22,3 ± 3,8
8	16,0 ± 1,6	17,1 ± 10,5	17,1 ± 10,8	28,0 ± 0,0	28,3 ± 9,0	9,2 ± 9,3
9	6,1 ± 1,1	6,9 ± 1,2	4,9 ± 1,7	4,8 ± 0,1	9,1 ± 3,2	4,5 ± 1,5
10	5,6 ± 0,7	4,7 ± 3,0	4,7 ± 3,3	4,8 ± 0,4	7,8 ± 3,3	5,1 ± 0,2
11	4,9 ± 0,5	4,4 ± 1,1	5,0 ± 0,2	7,2 ± 0,8	8,9 ± 1,8	4,3 ± 0,4
12	>100	ND	ND	18,3 ± 7,5	38,6 ± 7,7	>100
13	3,4 ± 0,8	3,4 ± 0,5	2,2 ± 1,2	4,1 ± 0,8	4,8 ± 2,3	6,7 ± 0,8
14	>100	>100	>100	>100	>50	>100
15	6,8 ± 0,1	30,1 ± 2,4	30,0 ± 4,3	5,4 ± 0,1	10,8 ± 4,7	5,9 ± 3,2
16	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	>100	>100	>100	>100	>100	>100
18	8,7 ± 0,5	14,2 ± 5,2	54,9 ± 5,4	18,6 ± 4,9	7,6 ± 1,1	12,9 ± 1,5
19	71,5 ± 4,9	ND	33,3 ± 0,0	>100	79,0 ± 2,8	43,2 ± 0,3
20	ND	ND	22,5 ± 0,0	ND	ND	6,3 ± 3,8
21	>100	>100	ND	>100	>100	>100
22	>100	ND	ND	>100	>100	>100
23	52,9 ± 1,6	ND	>30	>50	>50	81,5 ± 13,4
24	15,9 ± 2,1	ND	11,2 ± 0,0	41,1 ± 0,7	33,2 ± 1,3	9,5 ± 8,8
25	18,7 ± 1,3	ND	14,5 ± 1,2	19,3 ± 0,8	16,7 ± 0,5	3,6 ± 3,6
26	20,8 ± 1,8	12,5 ± 2,6	11,2 ± 1,8	41,4 ± 26,9	26,0 ± 5,7	2,7 ± 0,2
27	7,2 ± 0,4	6,2 ± 1,6	6,2 ± 2,0	6,0 ± 0,3	5,2 ± 0,4	2,6 ± 0,3
28	2,7 ± 0,3	7,4 ± 1,8	ND	9,8 ± 6,7	25,4 ± 19,8	10,6 ± 0,2
29	>100	>100	ND	ND	ND	>100
30	>100	>100	ND	>50	>50	>100
31	>100	>100	>100	>100	>50	>100
32	4,4 ± 0,9	5,2 ± 1,7	6,2 ± 0,6	4,6 ± 0,6	ND	3,8 ± 0,1
33	35,1 ± 5,5	33,2 ± 2,0	ND	>100	>100	39,3 ± 2,9
34	>100	>100	ND	>100	>100	>100
35	>30	>100	ND	>50	34,2 ± 1,5	>100
36	>100	>100	ND	>100	>100	>100
37	>100	>100	>100	>100	>100	>100
38	>100	>100	ND	>100	>100	>100
39	>100	>100	ND	>100	>100	ND
40	0,8 ± 0,0	1,8 ± 1,4	0,4 ± 0,6	4,3 ± 0,8	5,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2
41	29,6 ± 6,9	>100	ND	>100	>100	>100
42	62,3 ± 9,7	32,4 ± 4,0	ND	66,6 ± 19,2	60,9 ± 18,2	33,7 ± 5,2
43	21,5 ± 2,7	45,2 ± 0,5	45,2 ± 0,1	>50	35,9 ± 15,4	32,6 ± 8,1
44	>100	>100	>100	>100	>100	>100
45	19,1 ± 1,6	15,2 ± 2,3	15,2 ± 2,7	20,0 ± 14,4	19,2 ± 1,2	16,1 ± 3,3

Las células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante 72 h. El valor de la IC₅₀ se determinó por el método colorimétrico MTT. ND indica que los compuestos no se ensayaron en las líneas celulares correspondientes. Los resultados representan las medias ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

Tabla 1. Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las células de leucemia humana (continuación).

Compuestos	IC ₅₀ (μM)					
	HL-60	U937	U937/Bcl-2	K562	K562/ADR	Molt-3
46	>100	>100	>100	>100	>100	>100
47	7,8 ± 2,2	3,1 ± 0,1	4,2 ± 1,5	<50	14,7 ± 8,5	11,4 ± 10,4
48	6,6 ± 0,7	5,5 ± 6,6	5,5 ± 6,1	>100	>50	>30
49	>100	>100	>100	ND	ND	>100
50	>100	>100	ND	>100	>100	ND
41	>100	>100	ND	>100	>50	44,8 ± 4,6
52	>100	>100	ND	>100	>100	ND
53	>30	>100	ND	ND	>100	33,1 ± 15,1
54	>100	>100	ND	>100	>100	ND
55	53,0 ± 8,5	>100	ND	>100	11,6 ± 0,9	>100
56	>100	44,2 ± 1,6	ND	>100	>100	>100
57	>100	>100	ND	>100	>100	>100
58	29,6 ± 0,6	39,1 ± 2,7	ND	>100	>100	58,8 ± 3,5
59	25,9 ± 2,7	20,3 ± 3,0	ND	>100	>100	26,4 ± 0,4
60	>100	>100	ND	>100	>100	>100
61	55,1 ± 5,6	86,8 ± 7,4	ND	>50	19,3 ± 1,2	42,3 ± 1,1
62	31,7 ± 1,9	21,9 ± 4,5	ND	69,0 ± 15,8	>100	55,3 ± 7,5
63	>100	>100	ND	>100	>100	>100
64	ND	ND	ND	>50	>100	ND
65	>100	>100	ND	>100	>100	>100
66	>50	8,5 ± 1,7	ND	ND	ND	22,7 ± 2,5
67	>100	>100	ND	>100	>100	>100
68	36,0 ± 8,5	21,9 ± 0,2	ND	>100	>30	>100
69	>100	>100	ND	>100	>100	>100
70	28,3 ± 5,4	66,9 ± 22,1	ND	>100	>100	>100
71	>100	>100	ND	ND	ND	>100
72	36,0 ± 8,5	21,9 ± 0,2	ND	>100	>100	>100
73	>100	>100	ND	>100	>30	ND
74	>100	>100	ND	>100	>100	ND
75	>100	>100	ND	>100	>100	>100
76	ND	>100	ND	>100	>100	ND
77	25,9 ± 2,7	20,3 ± 3,0	ND	>100	>100	26,4 ± 0,4
78	>50	>30	ND	>100	>100	ND

Las células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante 72 h. El valor de la IC₅₀ se determinó por el método colorimétrico MTT. ND indica que los compuestos no se ensayaron en las líneas celulares correspondientes. Los resultados representan las medias ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

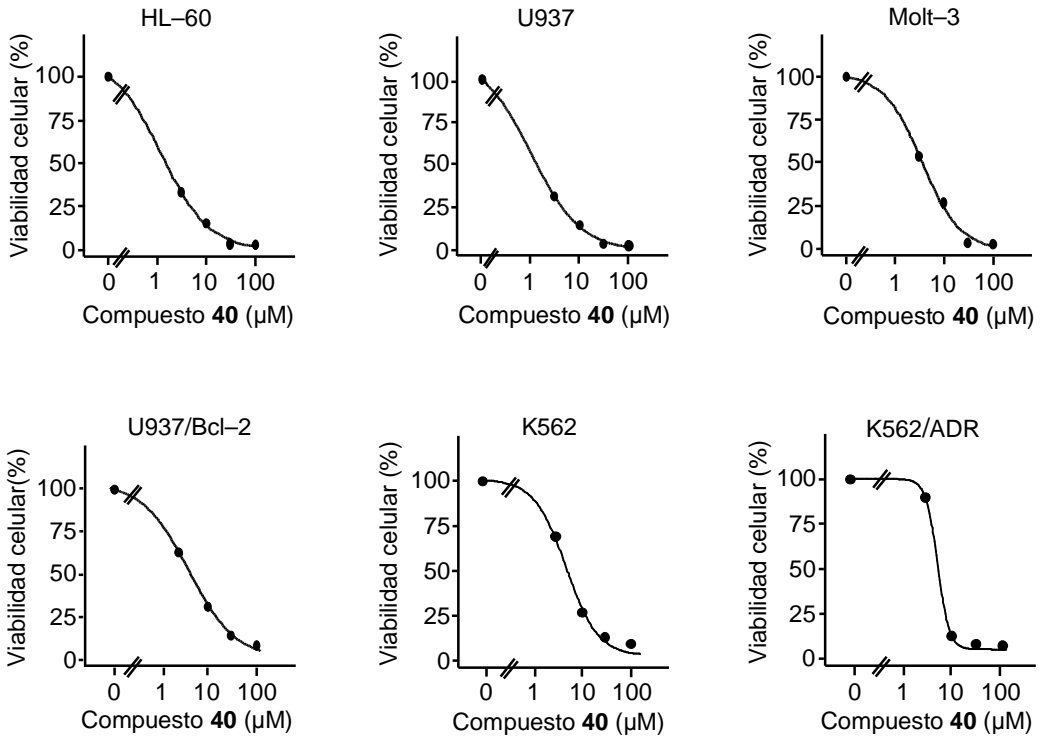


Figura 8. Efecto sobre la viabilidad celular. Las células se cultivaron durante 72 h en presencia de las concentraciones indicadas del compuesto **40** y la determinación de la IC₅₀ se realizó por el método de MTT. Los valores representan la media \pm S.E. de tres experimentos independientes, realizados cada uno por triplicado.

4.2 Evaluación de la morfología celular en células de leucemia humana tratadas con el compuesto 40

El tratamiento de las células leucémicas con concentraciones crecientes del compuesto **40** indujo importantes cambios morfológicos visualizados por microscopía de contraste de fases, observándose una disminución del número de células vivas y un aumento del número de células muertas en las muestras tratadas con este flavonoide (Figura 9). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en el estudio de MTT, en el que las células de leucemia humana reducen su tasa proliferativa en una relación dosis dependiente con el compuesto **40**.

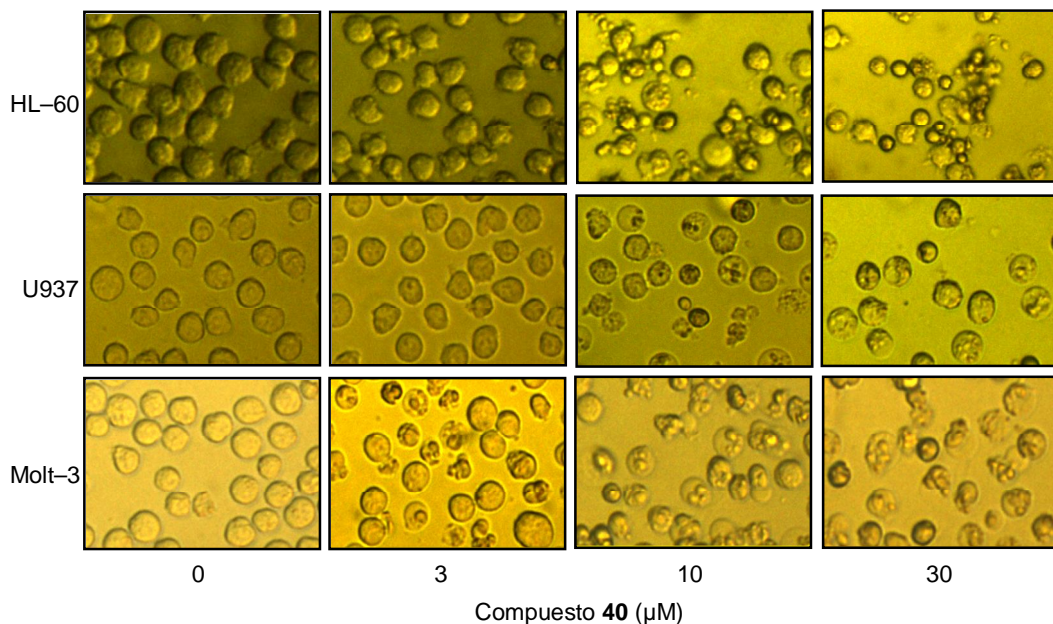


Figura 9. Estudio de la morfología celular por microscopía de contraste de fases utilizando un microscopio Zeiss. Las células se incubaron durante 24 h en presencia de las concentraciones indicadas del compuesto **40**.

4.3 El compuesto 40 induce apoptosis en las células de leucemia humana

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular que juega un papel esencial en el desarrollo y la supervivencia, en el que tienen lugar cambios morfológicos característicos como condensación nuclear, fragmentación del ADN y cambios ultraestructurales, además de la detención del ciclo celular. En el caso de células tumorales, este mecanismo no tiene lugar por sí mismo, siendo de sumo interés evaluar la capacidad de inducción de muerte por apoptosis que tiene el compuesto **40**. Para ello se utilizaron las células de leucemia mieloide humana (HL-60 y U937) y de leucemia linfóide humana (Molt-3) susceptibles de activar la muerte celular por apoptosis al tratarse con agentes quimioterapéuticos.

Para determinar si el compuesto **40** induce fragmentación del ADN, las células se trataron con concentraciones crecientes del flavonoide durante 24 h y el ADN genómico se extrajo, se separó en un gel de agarosa y se visualizó bajo la luz UV después de la tinción con bromuro de etidio. Los resultados indican que el flavonoide estimula la fragmentación del ADN típica de la apoptosis, en HL-60 y U937 (Figura 10 A). Para determinar si el compuesto **40** induce cambios en la morfología nuclear, las células se tiñeron con el fluorocromo trihidrocloruro de bisbencimida (Hoechst 33258) y se observaron por microscopía de fluorescencia. Como puede observarse (Figura 10 B) la condensación y la fragmentación de la cromatina, características de las células apoptóticas, fueron evidentes en las células HL-60, U937 y Molt-3.

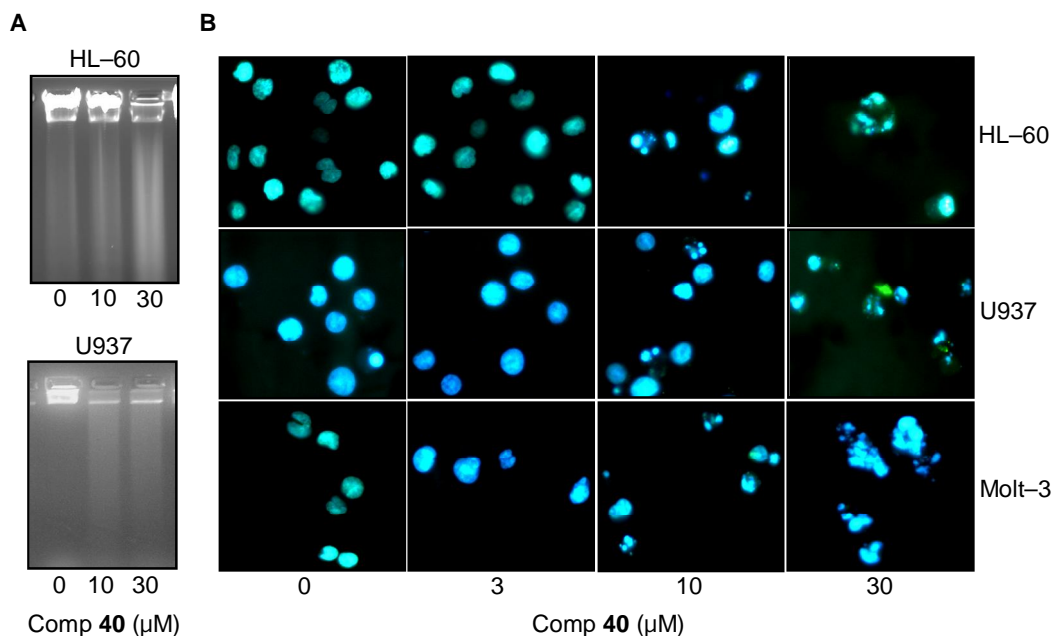


Figura 10. **(A)** Evaluación de la fragmentación del ADN. Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas del compuesto **40** y el ADN se aisló y su integridad se analizó en un gel de agarosa. **(B)** Efecto del compuesto **40** sobre la morfología nuclear en células leucémicas humanas. Las células se incubaron durante 24 h en presencia de las concentraciones indicadas del flavonoide, se tiñeron con Hoechst 33258 y los núcleos se visualizaron con un microscopio fluorescencia.

La microscopía electrónica nos permite observar en detalle, los cambios ultraestructurales de las células tratadas con concentraciones crecientes del compuesto **40**, identificándose claramente algunas características estructurales típicas de las células apoptóticas [89–91]. Después de 24 h de tratamiento (Figura 11) se observó contracción nuclear. En las células HL-60 y U937 se produjo condensación citoplasmática, conservándose la integridad de la mayoría de los orgánulos. Las células Molt-3 también presentaron condensación del citoplasma y mantuvieron la mayoría de los orgánulos intactos, excepto con la concentración máxima del compuesto **40** (30 μM). Además se puede observar una densa concentración perinuclear y la aparición de abundantes vacuolas, generadas por la pérdida de estructuras citoplasmáticas.

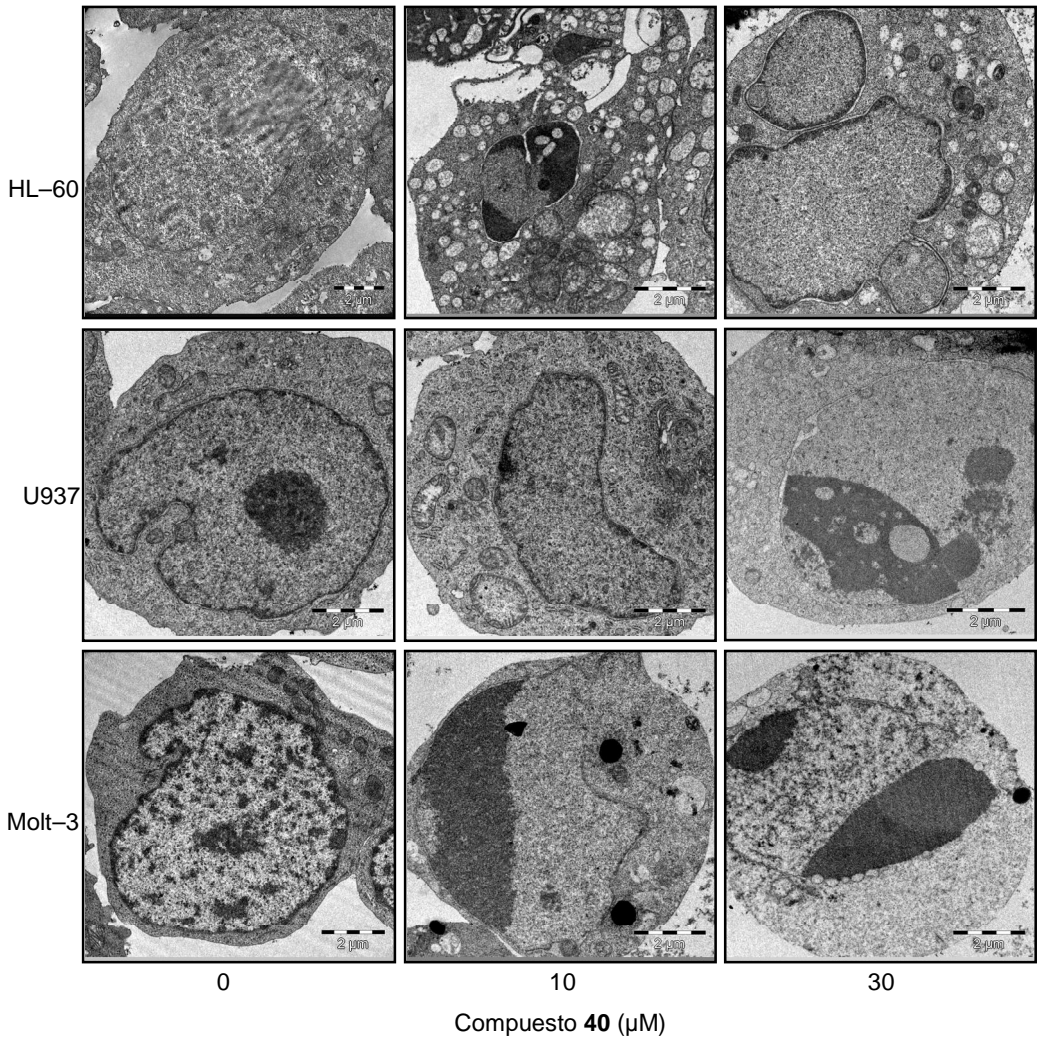


Figura 11. Estudio ultraestructural por microscopía electrónica. Las células se incubaron durante 24 h con las concentraciones indicadas del compuesto **40** y se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión. La barra mostrada es equivalente a 2 μm .

Para cuantificar el efecto de la apoptosis las células se incubaron con concentraciones crecientes del compuesto **40** (3 μM , 10 μM y 30 μM) durante tiempos variables (6 h, 12 h y 24 h) y se determinó el porcentaje de las células en la fase SubG₁ por citometría de flujo. En el caso de las HL-60, el porcentaje de células hipodiploides aumentó 12 y 13 veces después de 6 h y 12 h de tratamiento con 30 μM del flavonoide, respectivamente. Después de 24 h de tratamiento, con la misma concentración del compuesto **40**, el porcentaje de células hipodiploides aumentó 18 veces (Figura 12 A). En las células U937 el porcentaje de células apoptóticas aumentó 16 veces, 24 veces y 33 veces al tratar las células con 30 μM del compuesto **40**, durante 6 h, 12 h y 24 h, respectivamente (Figura 12 A). El porcentaje de células hipodiploides aumentó 6 veces en las células Molt-3 tratadas durante 6 h y 12 h con 30 μM del compuesto **40** y 13 veces, al tratarse con la misma concentración del flavonoide durante 24 h (Figura 12 A). Los valores máximos del porcentaje de células apoptóticas se alcanzaron con la máxima concentración del compuesto **40** utilizada (30 μM). La Figura 12 B muestra los histogramas representativos obtenidos con la concentración del compuesto **40** más efectiva (30 μM).

Para determinar si el efecto pro-apoptótico del compuesto **40** está asociado con alteraciones en el ciclo celular, las células se incubaron con concentraciones crecientes del flavonoide (3 μM , 10 μM y 30 μM) durante tiempos variables (6 h, 12 h y 24 h) y el porcentaje de las células en las diferentes fases del ciclo celular se determinó por citometría de flujo. En las células HL-60 el flavonoide indujo un aumento del porcentaje de células en la fase S desde $26,3 \pm 0,4\%$ en células control hasta $37,3 \pm 0,3\%$ en células tratadas con 3 μM del compuesto **40** durante 24 h (Tabla 2). En el caso de las células U937 el flavonoide indujo un aumento de la población en la fase S desde $27,6 \pm 1,0\%$ en células control hasta $37,5 \pm 1,9\%$ en células tratadas con 3 μM del compuesto **40** durante 24 h (Tabla 2). El porcentaje de células Molt-3 aumentó en la fase S desde $27,3 \pm 0,7\%$ en células control hasta $36,3 \pm 0,1\%$ en células tratadas con 3 μM del compuesto **40** durante 24 h (Tabla 2).

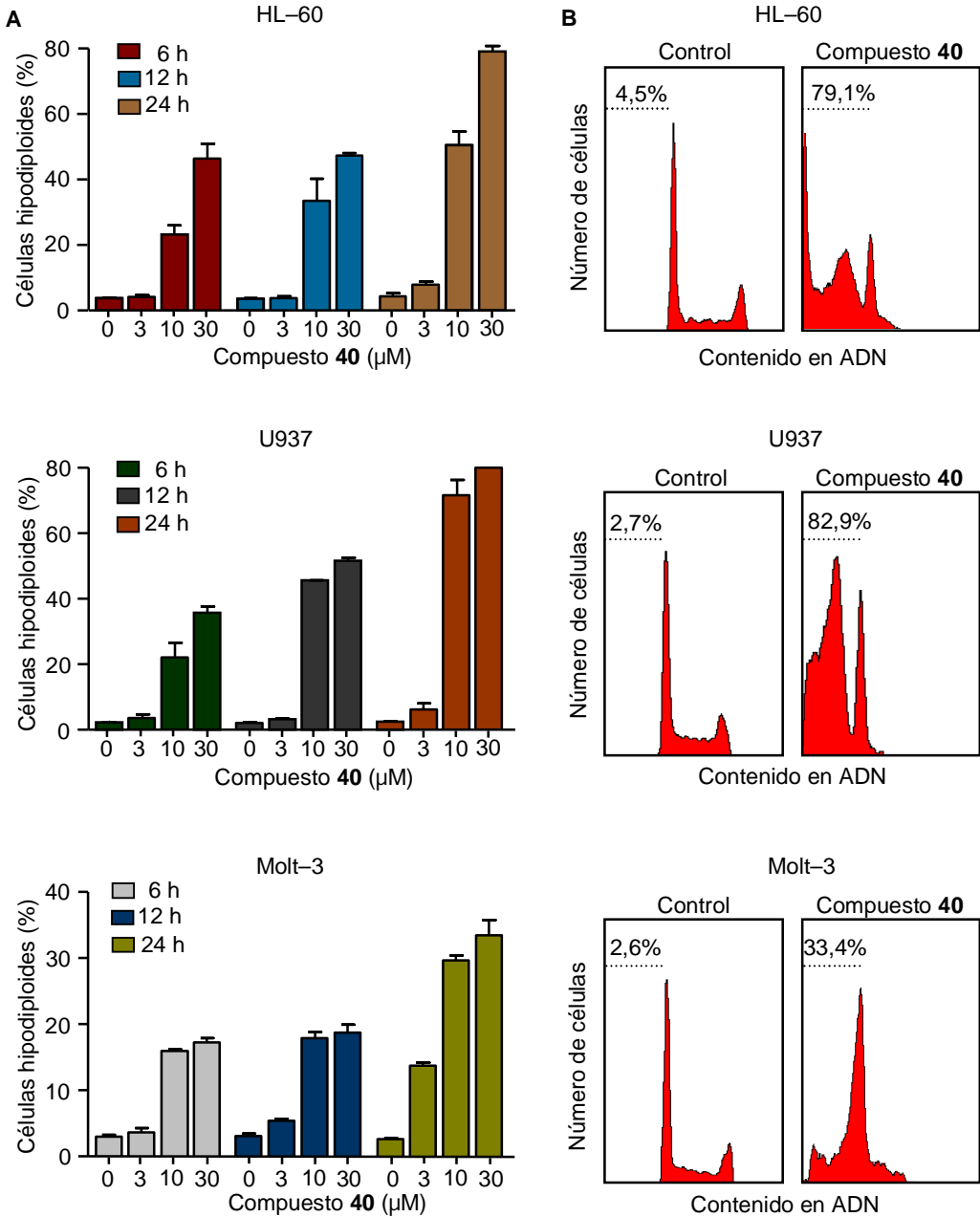


Figura 12. **(A)** Determinación del porcentaje de células hipodiploides en células de leucemia humana. Las células se trataron con concentraciones crecientes del compuesto **40** a los tiempos indicados, teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Los valores representan la media \pm S.E. de tres experimentos independientes. **(B)** Histogramas representativos del análisis del ciclo celular de células de leucemia humana tratadas con el compuesto **40** (30 μ M) durante 24 h. La región marcada con una línea discontinua representa el porcentaje de células hipodiploides.

Tabla 2. Efecto del compuesto **40** sobre las fases del ciclo celular en HL-60, U937 y Molt-3.

Tiempo (h)	Compuesto 40 (μM)	%SubG ₁	%G ₁	%S	%G ₂ /M
HL-60					
6	0	3,8 \pm 0,2	49,5 \pm 2,1	25,2 \pm 0,1	21,4 \pm 1,8
	3	4,2 \pm 0,4	57,0 \pm 0,2	21,3 \pm 0,0	17,4 \pm 0,2
	10	23,2 \pm 2,8	55,2 \pm 0,7	13,3 \pm 1,8	8,3 \pm 0,3
	30	46,4 \pm 4,4	41,7 \pm 4,4	4,5 \pm 1,0	7,4 \pm 1,0
12	0	3,6 \pm 0,2	48,7 \pm 1,3	28,3 \pm 1,0	19,5 \pm 0,5
	3	3,8 \pm 0,6	56,6 \pm 0,6	27,7 \pm 0,6	12,0 \pm 0,7
	10	33,6 \pm 6,7	52,0 \pm 4,2	10,1 \pm 2,3	4,3 \pm 0,3
	30	47,2 \pm 0,9	47,5 \pm 0,3	2,7 \pm 0,5	2,5 \pm 0,1
24	0	4,5 \pm 0,9	54,0 \pm 0,2	26,3 \pm 0,4	15,2 \pm 0,4
	3	8,0 \pm 0,8	44,2 \pm 0,8	37,3 \pm 0,3	10,4 \pm 0,3
	10	50,4 \pm 4,2	40,0 \pm 3,3	5,9 \pm 0,4	3,7 \pm 0,4
	30	79,1 \pm 1,6	16,7 \pm 1,2	3,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,1
U937					
6	0	2,3 \pm 0,2	46,9 \pm 1,3	27,3 \pm 2,7	23,0 \pm 0,7
	3	3,6 \pm 1,2	58,5 \pm 1,7	24,6 \pm 2,2	12,7 \pm 0,6
	10	22,3 \pm 4,4	54,9 \pm 4,6	15,6 \pm 0,0	6,7 \pm 0,2
	30	35,8 \pm 1,9	46,2 \pm 1,4	10,8 \pm 0,7	7,0 \pm 0,2
12	0	2,2 \pm 0,2	48,7 \pm 0,2	28,0 \pm 1,0	20,9 \pm 0,9
	3	3,3 \pm 0,2	52,8 \pm 0,6	32,9 \pm 0,6	10,7 \pm 0,2
	10	45,7 \pm 0,1	40,8 \pm 0,9	6,3 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1
	30	51,7 \pm 0,9	40,2 \pm 0,9	3,0 \pm 0,2	1,9 \pm 0,0
24	0	2,7 \pm 0,1	50,7 \pm 1,4	27,6 \pm 1,0	18,9 \pm 0,3
	3	6,4 \pm 1,8	40,6 \pm 0,8	37,5 \pm 1,9	15,5 \pm 0,9
	10	71,7 \pm 4,6	21,5 \pm 2,9	4,2 \pm 1,1	2,6 \pm 0,6
	30	82,9 \pm 1,3	13,8 \pm 0,9	2,7 \pm 0,4	0,6 \pm 0,1
Molt-3					
6	0	2,9 \pm 0,3	50,6 \pm 0,1	29,6 \pm 0,2	17,0 \pm 0,6
	3	3,6 \pm 0,7	63,6 \pm 0,5	24,3 \pm 1,3	8,4 \pm 0,1
	10	15,9 \pm 0,3	62,2 \pm 0,6	15,6 \pm 0,1	6,3 \pm 0,5
	30	17,2 \pm 0,6	59,3 \pm 1,2	16,7 \pm 0,5	6,8 \pm 1,2
12	0	3,0 \pm 0,4	53,4 \pm 1,4	26,7 \pm 0,0	16,8 \pm 0,8
	3	5,3 \pm 0,3	62,6 \pm 2,3	24,5 \pm 1,6	7,7 \pm 1,0
	10	17,9 \pm 0,9	66,0 \pm 1,8	13,0 \pm 1,0	3,1 \pm 0,1
	30	18,5 \pm 1,3	64,4 \pm 0,1	13,5 \pm 1,3	3,6 \pm 0,2
24	0	2,6 \pm 0,2	50,7 \pm 0,2	27,3 \pm 0,7	19,3 \pm 0,1
	3	13,7 \pm 0,5	42,0 \pm 0,5	36,3 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1
	10	29,6 \pm 0,8	52,2 \pm 0,4	16,3 \pm 0,3	1,8 \pm 0,0
	30	33,4 \pm 2,3	48,2 \pm 2,7	16,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3

Las células se incubaron con concentraciones crecientes del compuesto **40** durante los tiempos indicados. El porcentaje de células en cada fase del ciclo se determinó mediante citometría de flujo, después de la tinción con yoduro de propidio. Los valores representan la media \pm S.E. de tres experimentos independientes.

4.4 El compuesto **40** induce la activación de la vía de las caspasas

La muerte celular por apoptosis puede estar mediada por distintas vías, siendo una de ellas la activación de las caspasas. Para estudiar si esta vía interviene en la apoptosis inducida por el compuesto **40**, las células HL-60, U937 y Molt-3 se trataron con concentraciones crecientes (3 μM , 10 μM y 30 μM) durante 24 h y el procesamiento de las caspasas se determinó por transferencia Western usando anticuerpos específicos que se unen al proenzima y a los fragmentos activos (Figura 13). En primer lugar se analizaron las caspasas iniciadoras-8 y -9 y los resultados indican un aumento del procesamiento dependiente de la dosis en las tres líneas celulares. Posteriormente se determinó el efecto que tiene este compuesto en la principal caspasa efectora, caspasa-3, observándose la hidrólisis de ésta en fragmentos de 18–20 kDa en las líneas celulares HL-60 y U937 y una disminución del proenzima (procaspasa-3) en las células Molt-3. Este flavonoide también indujo el procesamiento de la procaspasa-6 en HL-60 y Molt-3, detectándose el fragmento de 20 kDa, mientras que en las células U937 se observó una disminución del nivel del proenzima (procaspasa-6). Además las procaspasas-4 y -7 se hidrolizaron en las tres líneas celulares, observándose los fragmentos correspondientes.

El procesamiento proteolítico de las caspasas no siempre está relacionado con la activación enzimática [85]. Para valorar esta relación las células Molt-3 y U937 se trataron con el compuesto **40** durante diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) y los lisados se utilizaron para medir la actividad de las caspasas-3, -6, -8, -9, en presencia de sustratos colorimétricos específicos de caspasa-3/-7 (DEVD-*p*NA), caspasa-6 (VEID-*p*NA), caspasa-8 (IETD-*p*NA) y caspasa-9 (LEHD-*p*NA). En Molt-3 (Figura 14) la actividad de la caspasa-3 se duplicó a las 6 h, mientras que no se observó una activación significativa de las caspasas-6, -8 y -9 a este tiempo. A las 12 h de tratamiento se detectaron los niveles máximos de activación enzimática, momento en el que la actividad de la caspasa-3 es aproximadamente 5 veces superior a la de su control, la actividad de las caspasa-6 y -8 prácticamente se duplica y la de la caspasa-9 se triplica. En las células U937 (Figura 15) destacan los valores de la actividad de caspasa-3 en respuesta al tratamiento con el compuesto **40** (30 μM), que aumenta 2 veces, 17 veces y 6 veces con respecto al control a las 6 h, 12 h y 24 h, respectivamente. La actividad de caspasa-6 no presentó ningún aumento significativo

respecto a su control a los distintos tiempos. La actividad de caspasa-8 aumentó aproximadamente el doble de la actividad de sus controles, a las 6 h, 12 h y 24 h de tratamiento con 30 μM del compuesto **40**. La actividad de la caspasa-9 se duplicó a las 6 h de tratamiento para las células tratadas con 10 μM y 30 μM del compuesto **40** y para las células incubadas durante 12 h con 10 μM del compuesto **40**. A las 12 h de tratamiento con 30 μM del compuesto **40**, el valor de la actividad caspasa-9 aumentó casi 4 veces, respecto al control y disminuyó al nivel de los controles a las 24 h de tratamiento.

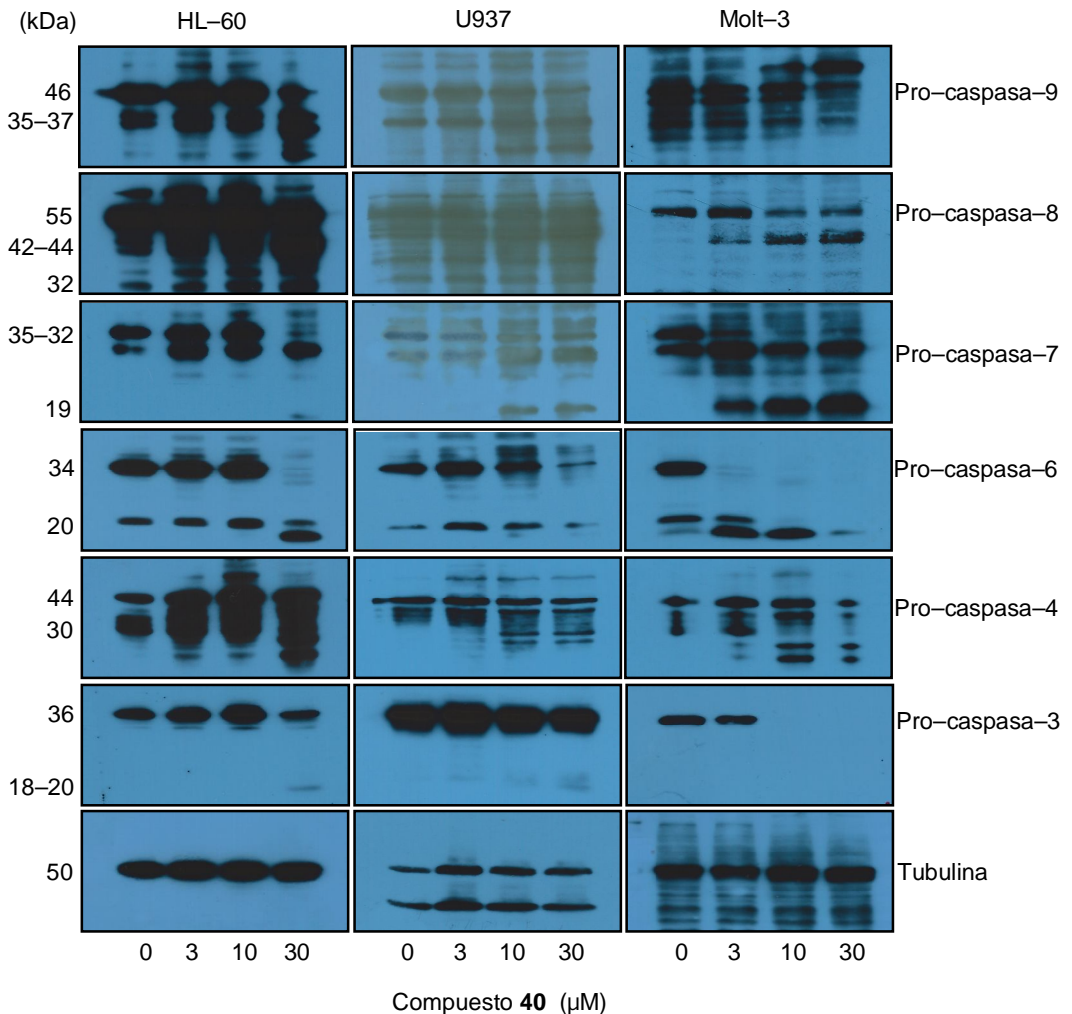


Figura 13. Estudio del procesamiento de las caspasas en respuesta al flavonol **40**. Las células se trataron con concentraciones crecientes de este compuesto durante 24 h y los extractos celulares se analizaron por transferencia Western. La tubulina se usó como control de carga.

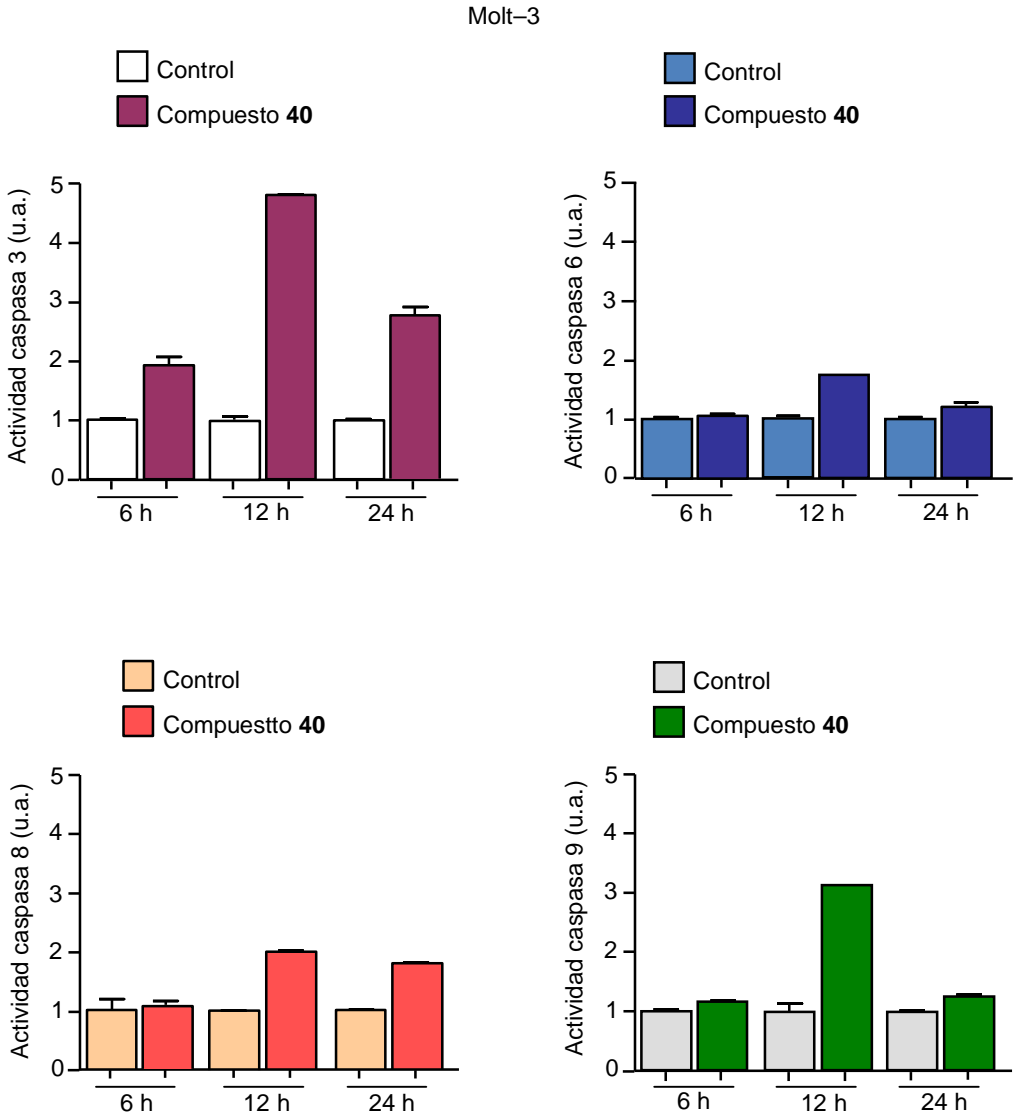


Figura 14. Estudio de la dependencia del tiempo de la activación de las caspasas en células Molt-3. Las células se trataron con el compuesto **40** (10 μ M) a los tiempos indicados. Los lisados se utilizaron para medir la actividad caspasa-3, -6, -8, -9, utilizando los sustratos colorimétricos específicos DEVD-pNA (caspasa-3/7), VEID-pNA (caspasa-6), IETD-pNA (caspasa-8) y LEHD-pNA (caspasa-9). Los resultados representan el aumento de la actividad respecto al control. Los valores representan la media \pm S.E de tres experimentos independientes.

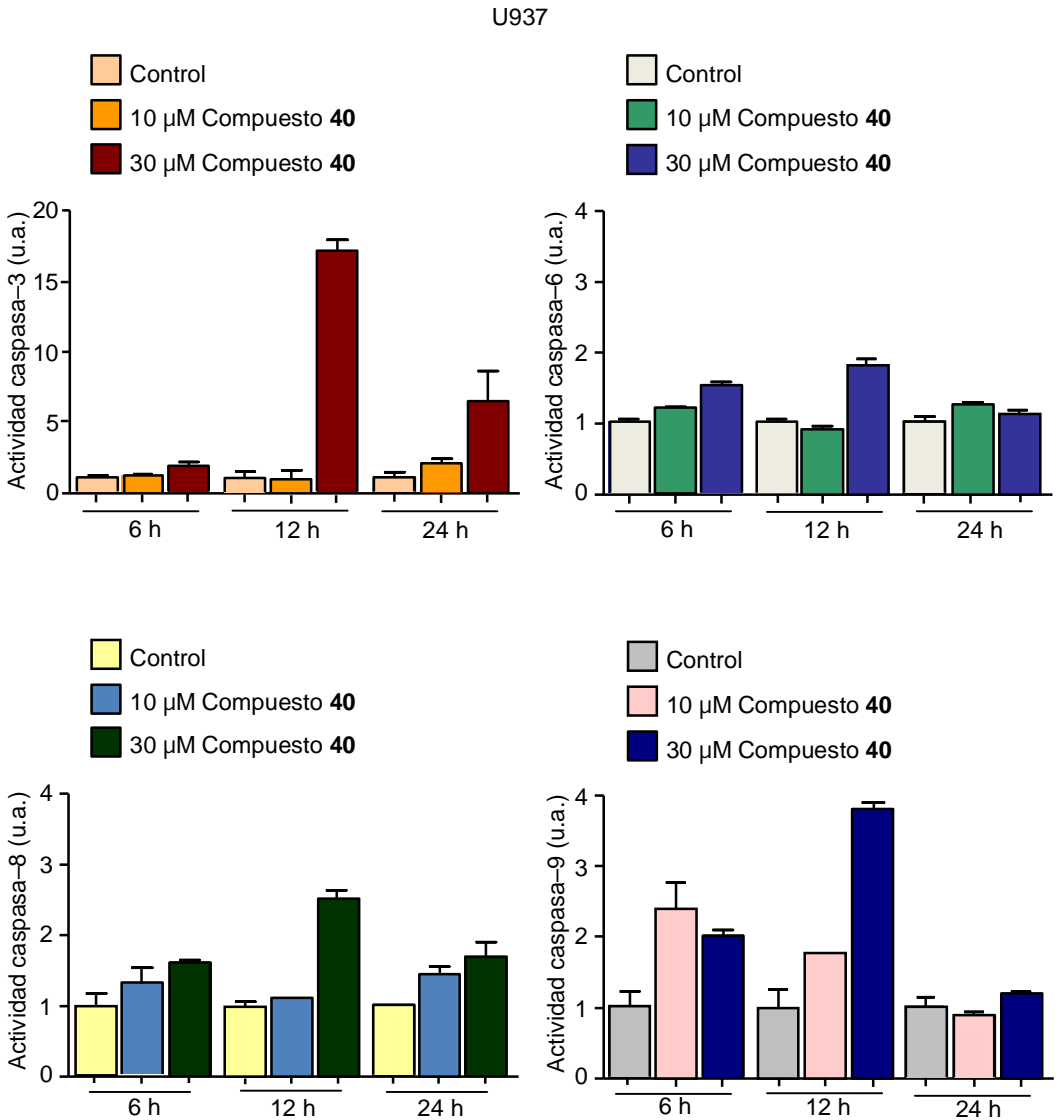


Figura 15. Evaluación de la activación de las caspasas con respecto al tiempo en las células U937. Las células se trataron con 10 μ M y 30 μ M del compuesto **40** durante los tiempos indicados. Los lisados se usaron para determinar la actividad de las caspasas-3, -6, -8 y -9. Los resultados muestran el aumento de actividad respecto al control. Los valores representan la media \pm S.E de tres experimentos independientes.

Para confirmar que la muerte celular inducida por el compuesto **40** es dependiente de las caspasas, se evaluó el efecto de inhibidores de estas proteasas. Para ello las células U937 se pretrataron durante 1 h con el inhibidor general de las caspasas z-VAD-fmk (100 μ M) y posteriormente se incubaron con 30 μ M del compuesto **40** durante diferentes tiempos (12 y 24 h). El porcentaje de células hipodiploides se determinó por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio. Los resultados obtenidos indican que la muerte celular inducida por este flavonoide es dependiente de la vía de las caspasas, ya que se observó una reducción significativa en el número de células hipodiploides en presencia del inhibidor general de caspasa a las 12 h y a las 24 h (Figura 16).

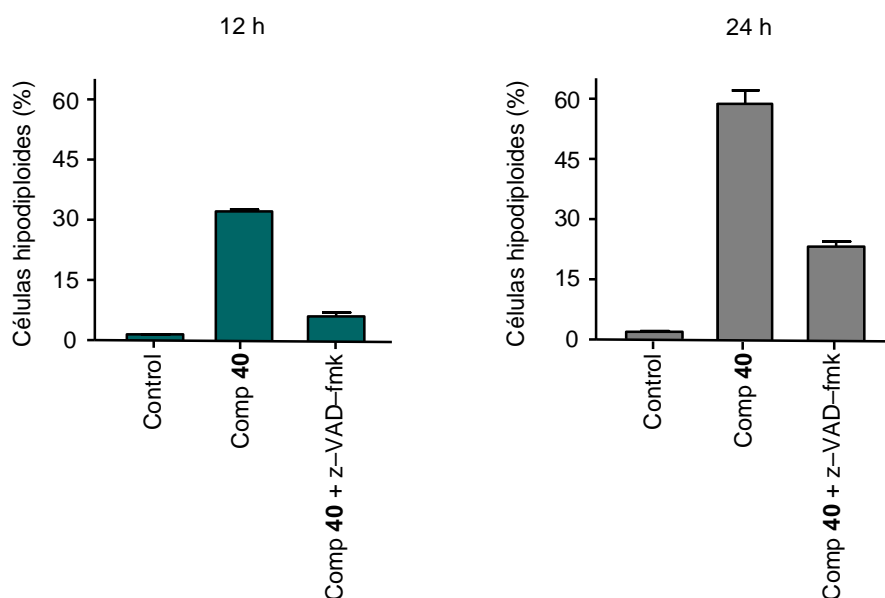


Figura 16. Efecto del inhibidor general de las caspasas z-VAD-fmk sobre el porcentaje de células hipodiploides. Las células U937 se pretrataron durante 1 h con el inhibidor z-VAD-fmk (100 μ M) y a continuación se incubaron con el compuesto **40** (30 μ M) durante los tiempos indicados. Los valores representan la media \pm S.E. de tres experimentos independientes.

Para identificar qué caspasas están involucradas en la apoptosis inducida por el compuesto **40**, se estudió el efecto de los inhibidores específicos de caspasas z-IETD-fmk (inhibidor de caspasa-8) (50 μ M) y z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9) (50 μ M), responsables de la activación de la vía extrínseca e intrínseca, respectivamente, y de las caspasas ejecutoras z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3/-7) (50 μ M) y VEID-CHO (inhibidor de caspasa-6) (25 μ M), en las líneas HL-60, U937 y Molt-3. Las células se pretataron con cada inhibidor durante 1 h y a continuación se cultivaron en presencia de 30 μ M del compuesto **40** durante 12 h.

Los resultados (Figura 17) ponen de manifiesto que en U937 el porcentaje de células hipodiploides disminuyó significativamente, desde 34,6% a 8,3% en presencia de z-DEVD-fmk y desde 34,6% a 26,6% en presencia de z-IETD-fmk, indicando que la caspasa-3 y la caspasa-8 (vía extrínseca) desempeñan un papel importante en el proceso apoptótico inducido por el compuesto **40**; estos resultados están en concordancia con la hidrólisis de la procaspasa-8 (Figura 13). Las células U937 pretratadas con VEID-CHO y con z-LEHD-fmk no bloquearon la apoptosis inducida por el compuesto **40** (Figura 17). En las células Molt-3 pretratadas con z-DEVD-fmk el porcentaje de células hipodiploides disminuyó de 26,1% a 3,8% (Figura 17), en presencia del inhibidor específico z-IETD-fmk la disminución fue de 26,1% a 9,6%, mientras que con el inhibidor z-LEHD-fmk se produjo una disminución del porcentaje de células hipodiploides desde el 26,1% al 4,2%, inhibiéndose el proceso apoptótico casi completamente. Estos resultados son coherentes con la hidrólisis de las procaspasas-8 y -9 observada en la Figura 13 y con la activación de las rutas intrínseca y extrínseca. El inhibidor de la caspasa-6 (VEID-CHO) no fue capaz de bloquear la apoptosis en ninguna de las líneas leucémicas, a pesar de que la procaspasa-6 se hidrolizó en todas las líneas celulares en estudio (Figura 13) indicando que esta caspasa no participa en el proceso apoptótico inducido por el compuesto **40**. Los resultados indican que este flavonoide indujo procesamiento de múltiples caspasas en las tres líneas ensayadas y al menos en las líneas U937 y Molt-3 los inhibidores específicos de caspasas-8 y -9 bloquearon significativamente la apoptosis inducida por el compuesto **40**. En cambio en la línea HL-60 ningún inhibidor específico fue capaz de bloquear la muerte celular, sugiriendo que otras vías de señalización pueden estar implicadas.

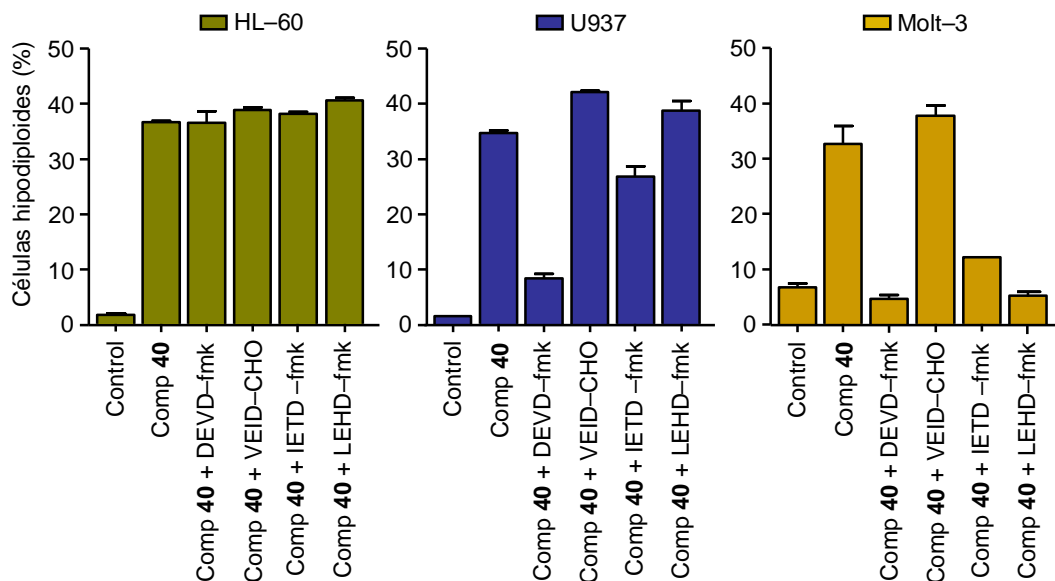


Figura 17. Efecto de los inhibidores específicos de caspasas sobre la muerte celular por apoptosis inducida por el compuesto **40**. Las células HL-60, U937 y Molt-3 se trataron con 30 μM del compuesto **40** durante 12 h, después de un pretratamiento de 1 h con z-DEVD-fmk (50 μM), VEID-CHO (25 μM), z-IETD-fmk (50 μM) y z-LEHD-fmk (50 μM). Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Los valores representan la media \pm S.E. de tres experimentos independientes.

4.5 Papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por el compuesto **40**

Las mitocondrias desempeñan un papel importante en coordinar la activación de caspasas a través de la liberación de factores pro-apoptóticos. La presencia de proteínas mitocondriales en el citosol, tiene una gran importancia en el proceso de muerte celular por apoptosis. Por este motivo se trataron las células HL-60 y U937 con concentraciones crecientes del compuesto **40**, durante 24 h y posteriormente se analizaron las fracciones citosólicas por transferencia Western. Los resultados demuestran un aumento de los niveles de citocromo c en este compartimento en HL-60 y U937, dependiente de la concentración del compuesto **40** (Figura 18 A). Además, se observó un ligero aumento de Smac-DIABLO en las células HL-60 (datos no presentados). El compuesto **40** también redujo los niveles citosólicos de Bax y Bid (Figura 18 A). En la Figura 18 B se observa una disminución de Bid en las dos líneas celulares. Los datos obtenidos demostraron que este flavonol indujo el procesamiento de

Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) (datos no presentados) y Bax (proteína pro-apoptótica). El aumento de los niveles de citocromo *c* observados, indican que Bax, respondiendo a estímulos pro-apoptóticos, indujo el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, facilitando el proceso apoptótico.

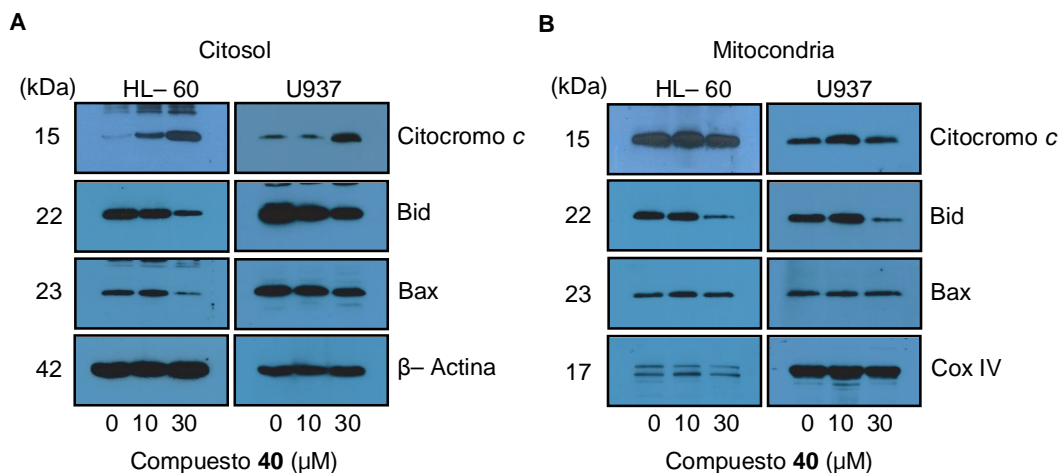


Figura 18. **(A)** Efecto del compuesto **40** sobre la liberación del citocromo *c* y su efecto sobre los niveles de las proteínas citosólicas Bax y Bid en el citosol. **(B)** Efecto del compuesto **40** sobre la liberación del citocromo *c* y su efecto sobre los niveles de las proteínas citosólicas Bax y Bid en la mitocondria. Las células se incubaron durante 24 h con las concentraciones del flavonoide indicadas y los lisados se analizaron por inmunotransferencia. La β -Actina y la citocromo *c* oxidasa se usaron como control de carga de la fracción citosólica y mitocondrial, respectivamente.

La hidrólisis y activación de la proteína pro-apoptótica Bid favorece el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, previniendo el efecto inhibitorio de Bcl-2 [61]. Los resultados demuestran que el compuesto **40** induce hidrólisis de Bid en HL-60, U937 y Molt-3. En las células, monómeros inactivos de Bax residen en el citosol, de manera que la disminución de los niveles de Bax en la fracción citosólica [62] indica la activación de esta proteína en células tratadas con concentraciones crecientes del compuesto **40**. De la misma manera Bid se encuentra en el citosol [92] y la disminución de los niveles de esta proteína en la fracción citosólica, indica su activación al tratar las células de leucemia con concentraciones crecientes del compuesto **40**.

4.6 El compuesto **40** induce la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) están involucradas en la regulación de funciones celulares importantes e incluyen las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1/2, que regulan el crecimiento, la supervivencia y la proliferación [73,76], y las proteínas pro-apoptóticas p38^{MAPK} y JNK/SAPK que juegan frecuentemente un papel pro-apoptótico [93–95]. Con el fin de valorar si el compuesto **40** promueve cambios en la fosforilación, y por lo tanto de la actividad de las MAPKs, las células HL–60, U937 y Molt–3 se incubaron a diferentes tiempos en presencia de concentraciones crecientes de este flavonoide. El tiempo máximo de tratamiento se estableció en 6 h para evitar el efecto citotóxico del flavonoide, que aparece después de las primeras 12 h.

En la Figura 19 se puede observar que en HL–60 la fosforilación de ERK1/2 tuvo lugar a partir de la primera hora de tratamiento, tanto para la concentración de 10 μM como para la de 30 μM . La fosforilación de p38^{MAPK} fue transitoria y se detectó únicamente a las 2 h y 4 h del tratamiento con 10 μM del compuesto **40**. En cambio, la fosforilación de JNK/SAPK sólo se observó a las 2 h de tratamiento y únicamente con la máxima concentración del compuesto **40** utilizada. En U937 tratadas con este flavonoide (10 μM) (Figura 20) también se estimuló la fosforilación de ERK1/2 y, en este caso, el enzima permaneció fosforilado durante las 6 h de tratamiento. Una concentración mayor del flavonoide (30 μM) indujo una activación bifásica de ERK1/2. En estas células, el compuesto **40** también indujo una fosforilación transitoria de p38^{MAPK} alcanzándose máximos niveles de fosforilación a las 2 h (10 μM) y a 0,5 h (30 μM). En células Molt–3 (Figura 21) el flavonol **40** (10 μM) estimuló la fosforilación de ERK1/2 a partir de las 2 h y los máximos niveles de fosforilación se observaron a las 6 h. Sin embargo, este efecto no se apreció en las células tratadas con una concentración de 30 μM del compuesto **40**. La activación de p38^{MAPK} se detectó desde la primera hora de tratamiento con 10 μM del flavonoide. En células Molt–3 ambas concentraciones del flavonoide fueron incapaces de promover la fosforilación de JNK/SAPK.

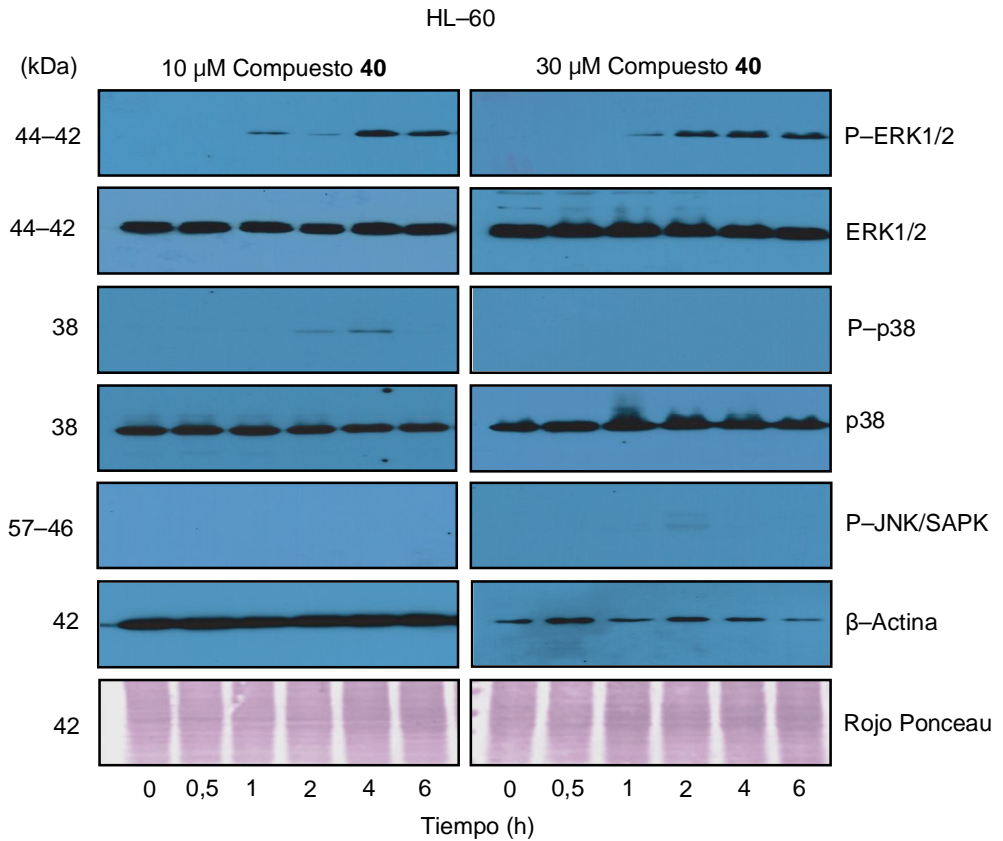


Figura 19. Evaluación del efecto del compuesto **40** sobre las MAPKs en HL-60. Las células se trataron con 10 μM y 30 μM del flavonoide a los tiempos indicados y los extractos de proteínas se analizaron por transferencia Western.

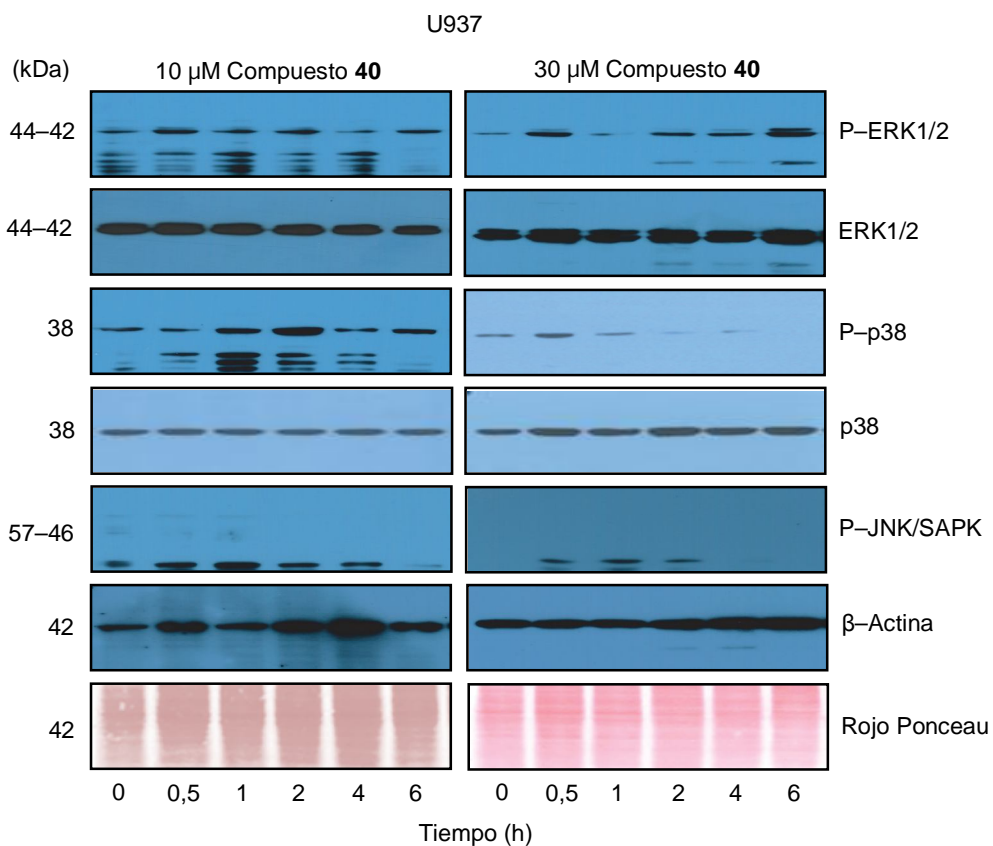


Figura 20. Evaluación del efecto del compuesto **40** sobre las MAPKs en U937. Las células se trataron con 10 μM y 30 μM del flavonoide a los tiempos indicados y los extractos de proteínas se analizaron por transferencia Western.

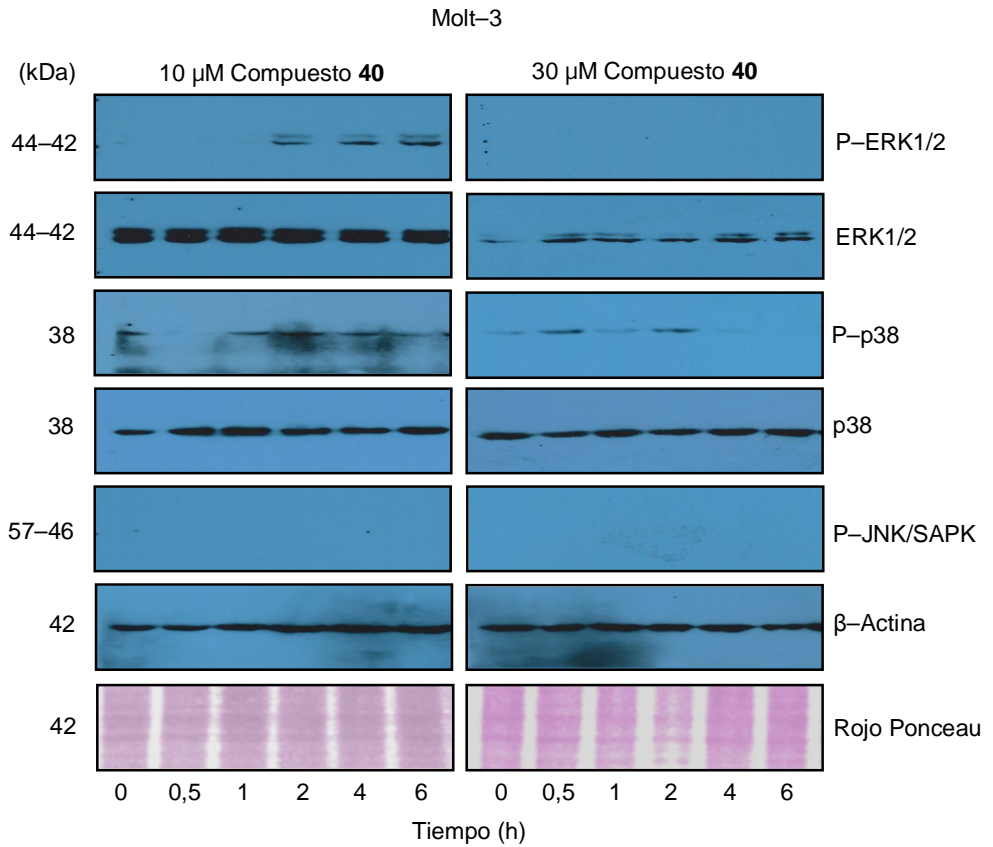


Figura 21. Evaluación del efecto del compuesto **40** sobre las MAPKs en Molt-3. Las células se trataron con 10 μ M y 30 μ M del flavonoide a los tiempos indicados y los extractos de proteínas se analizaron por transferencia Western.

Para determinar si la fosforilación de las MAPKs desempeña alguna función en el proceso apoptótico inducido por el compuesto **40**, se evaluaron una serie de inhibidores específicos de esta vía. Las células HL-60, U937 y Molt-3 se pretrataron 1 h con SB203580 (inhibidor de p38^{MAPK}, 2 μ M), SP600125 (inhibidor de JNK/SAPK, 10 μ M), PD98059 y U0126 (inhibidores de MEK1/2, 10 μ M) y posteriormente se incubaron con el flavonoide (30 μ M) durante 12 h y el porcentaje de células hipodiploides se determinó por citometría de flujo. Los resultados (Figura 22) demuestran que ningún inhibidor fue capaz de bloquear el aumento del número de células hipodiploides [96,97] y sugieren que las proteínas quinasas activadas por mitógenos no intervienen en el proceso apoptótico inducido por el compuesto **40**.

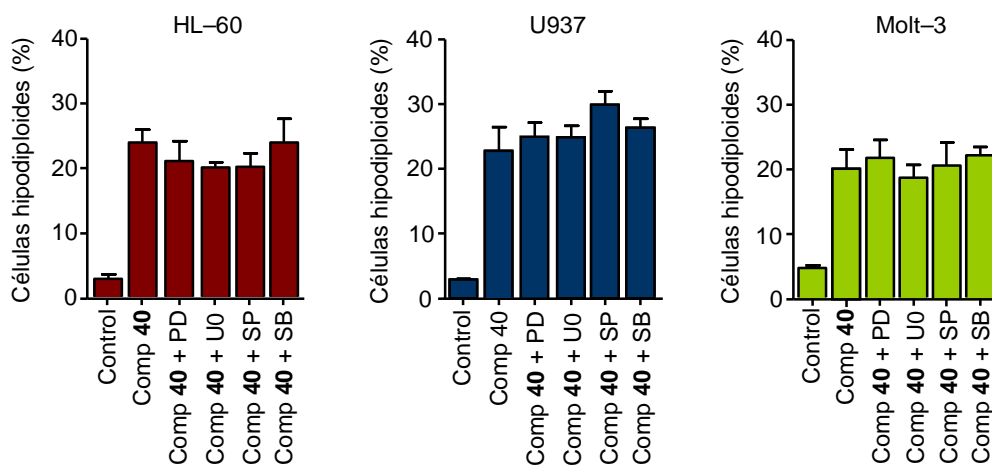


Figura 22. Efecto de los inhibidores de las MAPKs sobre la apoptosis inducida por el compuesto **40** en células leucémicas humanas. Las células se preincubaron con PD98059 (PD, 10 μ M), U0126 (UO, 10 μ M), SP600125 (SP, 10 μ M) y SB203580 (SB, 2 μ M) durante 1 h y posteriormente con el compuesto **40** (30 μ M) durante 12 h. El porcentaje de células hipodiploides se determinó por citometría de flujo. Los valores representan la media \pm S.E. de tres experimentos independientes.

4.7 Evaluación del papel de ROS en la inducción de apoptosis por el compuesto 40

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son mediadoras esenciales de la actividad de muchos agentes antitumorales. Trabajos previos han demostrado que la generación intracelular de ROS es crucial en la actividad de agentes quimioterapéuticos inductores de apoptosis [98,99]. Para evaluar el papel que desempeña ROS en el proceso pro-apoptótico inducido por el compuesto **40** se determinaron los niveles de estas especies químicas en HL-60 y U937. Las células se incubaron durante 2 h con el flavonoide (10 μ M y 30 μ M) y se analizaron por citometría de flujo en presencia de la sonda diacetato de 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína (H_2 -DCF-DA), que emite fluorescencia cuando es oxidada. Los resultados obtenidos en HL-60 (Figura 23 A, B) indican que el compuesto **40** induce la generación de ROS mientras que en U937 no se observó aumento de los niveles de estas especies reactivas de oxígeno (Figura 23 C).

Se estudió la importancia que tiene la generación de ROS en el proceso apoptótico inducido por el compuesto **40**. Para ello se preincubaron las células HL-60 con diferentes antioxidantes. La *N*-acetil-L-cisteína (NAC, 10 mM) es un antioxidante con un grupo funcional tiol que es capaz de inactivar ROS directamente y de inducir la síntesis del glutatión [100]. El α -tocoferol (Vitamina E, 25 μ M) neutraliza radicales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los radicales hidroxilo ($\cdot OH$). El trolox (2 mM) es un antioxidante cuyo efecto protector está basado en la capacidad de inhibir la peroxidación de los lípidos de membrana [101,102] y el cloruro de difeniliodonio (DPI, 20 μ M) es un inhibidor de la NADPH oxidasa [103]. Las células leucémicas se pretrataron (1 h) con los distintos antioxidantes y a continuación se incubaron durante 12 h con el flavonol (30 μ M). En la Figura 23 D se aprecia que los antioxidantes fueron incapaces de suprimir la muerte celular en HL-60, de manera que no hay indicios de la participación de ROS en la muerte celular inducida por el compuesto **40**.

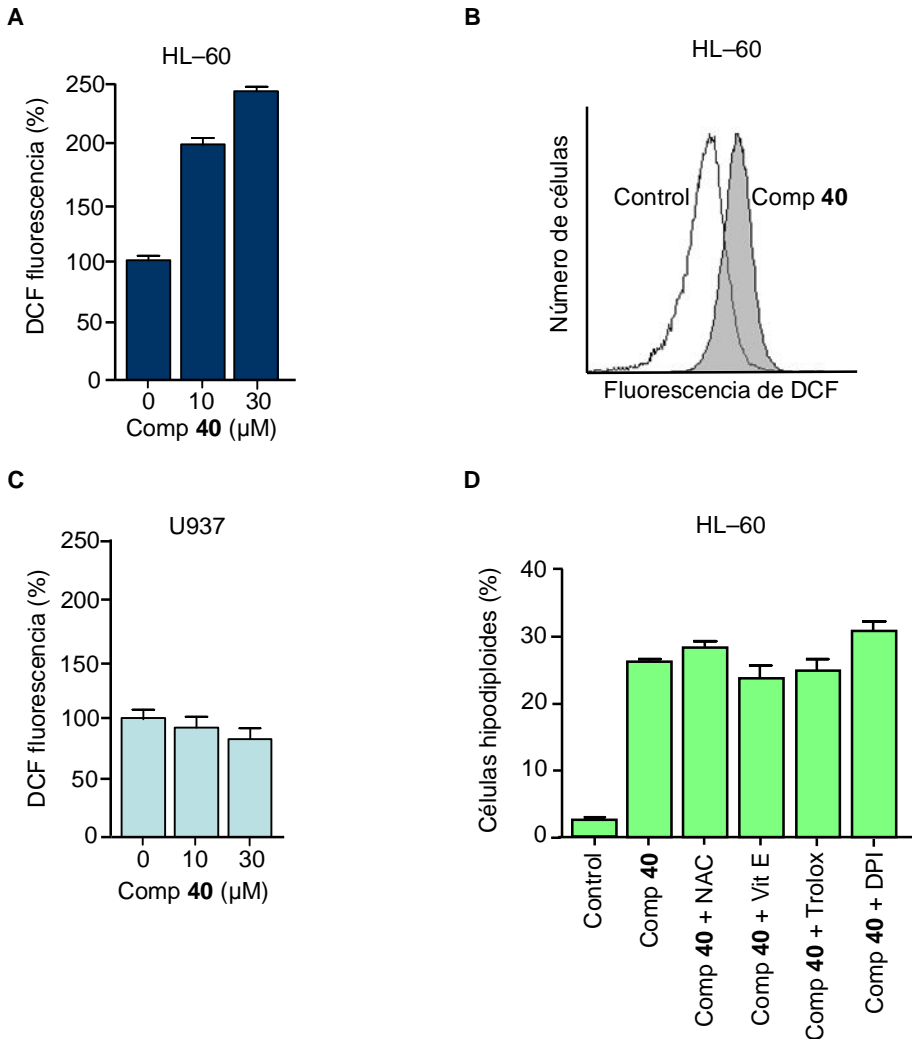


Figura 23. (A) Estudio de la generación de ROS en HL-60. Las células se incubaron con 10 μM y 30 μM del compuesto **40** durante 2 h y se analizaron por citometría de flujo utilizando la sonda diacetato de 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA). (B) Histograma representativo de la generación de ROS en HL-60. Las células se trataron con 30 μM del compuesto **40** durante 2 h. (C) El compuesto **40** no induce generación de ROS en U937. Las células se incubaron con concentraciones crecientes del compuesto **40** durante 2 h. (D) Las células HL-60 se se preincubaron durante 1 h con los antioxidantes, NAC (10 mM), Vitamina E (25 μM), Trolox (2 mM) y DPI (20 μM) y fueron tratadas durante 12 h con el compuesto **40** (30 μM), determinándose el porcentaje de células hipodiploides por citometría de flujo.

CONCLUSIONES

1. Se han evaluado los efectos de 78 flavonoides sintéticos sobre la viabilidad de seis líneas de leucemia humana incluyendo células que sobre-expresan Bcl-2 y la glicoproteína P.
2. La chalconas y flavonoles fueron los compuestos que presentaron propiedades citotóxicas relevantes en las líneas celulares analizadas.
3. Las chalconas más potentes contienen un radical 2'-benciloxi y un halógeno o un radical α -piridilo en posición 4.
4. Los flavonoles más potentes se caracterizan por poseer: (i) un halógeno o un radical trifluorometilo en posición 4', (ii) dos radicales benciloxi en posiciones 3' y 4' y (iii) un radical morfolino en la posición 4' en flavonoles 5 sustituidos.
5. El 3',4'-dibenciloxiflavonol (compuesto **40**) demostró ser el más potente en las líneas de leucemia humana, incluyendo las que sobre-expresan Bcl-2 y la glicoproteína P e induce parada del ciclo celular en la fase S y muerte celular por apoptosis a través de un mecanismo dependiente de las caspasas-3, -8 y -9.
6. La apoptosis inducida por el compuesto **40** está asociada con la liberación de citocromo c al citosol y la disminución de los niveles de Bax y Bid en este compartimento celular.
7. El compuesto **40** activa la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos p38, JNK y de forma bifásica a ERK1/2 e induce la generación de las especies reactivas de oxígeno.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sun HJ, Chen J, Ni B, Yang X, Wu YZ. Recent advances and current issues in single-cell sequencing of tumors. *Cancer Lett.* 2015;365:1–10.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
- [3] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula.* 5ª Edición. Barcelona. Ediciones Omega S.A. 2010.
- [4] Morceau F, Chateauvieux S, Orsini M, Trecul A, Dicato M, Diederich M. Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways. *Biotechnol Adv.* 2015;33:785–97.
- [5] SEOM. Grupos Cooperativos Nacionales de Investigación en Oncología Médica. Dossier Mayo 2014.
- [6] Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SM. Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients.* 2015;7:7708-28.
- [7] Dey P, Chaudhuri TK. Pharmacological aspects of *Nerium indicum* Mill: A comprehensive review. *Pharmacogn Rev.* 2014;8:156-62.
- [8] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96:67–202.
- [9] Nicolaou KC, Vourloumis D, Winssinger N, Baran PS. The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000;39:44–122.
- [10] Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999;37:937–42.
- [11] Abbasi AM, Guo X, Fu X, Zhou L, Chen Y, Zhu Y, Yan H, Liu RH. Comparative Assessment of Phenolic Content and in Vitro Antioxidant Capacity in the Pulp and Peel of Mango Cultivars. *Int J Mol Sci.* 2015;16:13507–27.
- [12] Noratto GD, Bertoldi MC, Krenek K, Talcott ST, Stringheta PC, Mertens-Talcott SU. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58:4104–12.

- [13] Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact.* 2000;17:311–49.
- [14] Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:381–406.
- [15] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev.* 2003;23:519–34.
- [16] Masibo M, He Q. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2008;7:309–319.
- [17] Deng GF, Lin X, Xu XR, Gao LL, Xie JF, Li HB. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *J. Funct. Foods.* 2013;5:260–66.
- [18] Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:560–8.
- [19] Yang CS, Lambert JD, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;224:265–73.
- [20] Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52:673–751.
- [21] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015;22:526–39.
- [22] Wyllie AH, Kerr JFR, and Curde AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980;68:251–306.
- [23] Gervais O, Renault T, Arzul I. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;46:232–42.
- [24] Mácsik LL, Somogyi I, Opper B, Bovári-Biri J, Pollák E, Molnár L, Németh P, Engelmann P. Induction of apoptosis-like cell death by coelomocyte extracts from *Eisenia andrei* earthworms. *Mol Immunol.* 2015;15:00408–3.
- [25] Cohen. J. J. Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* 1991;50:55–85.

- [26] Yanquin S, Yan S, Zhenjun L, Shijie W, Chong L, Yan G. Coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HL-60 cells in vitro. *Eur. J. Soil Biol.* 2007;43:143–148.
- [27] Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, and Kerr JFR. An electron–microscope study of the mode of cell death induced by cancer–chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J. Pathol.* 1975;116:129–38.
- [28] Galili U, Leizerowitz R, Moreb J, GamLiel H, Gurfel D, Polliack A. Metabolic and ultrastructural aspects of the in vitro lysis of chronic lymphocytic leukemia cells by glucocorticoids. *Cancer Res.* 1982;42:1433–40.
- [29] Armstrong DK, Isaacs JT, Oltaviano YL, and Davidson NE. Programmed cell death in an estrogen–independent human breast cancer cell line, MDA–MB–468. *Cancer Res.* 1992;52:3418–3424.
- [30] Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF and Sikorska M. Topoisomerase II–reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* 1991;51:1078–85.
- [31] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El–Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19:107–20.
- [32] Fares M, Abedi–Valuggerdi M, Hassan M, Potáčová Z. DNA damage, lysosomal degradation and Bcl–xL deamidation in doxycycline– and minocycline–induced cell death in the K562 leukemic cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463:268–74.
- [33] Henke J, Engelmann J, Kutscher B, Nssner G, Engel J, Voegeli R. Changes of intracellular calcium, fatty acids and phospholipids during miltefosine–induced apoptosis monitored by fluorescence– and ¹³C NMR–spectroscopy. *Anticancer Res.* 1999;19:4027–32.
- [34] Wang YZ, Chang YB, Xing C, Fu D. The interference effects of hexadecylphosphocholine on proliferation and membrane phospholipid metabolism in human myeloid leukemia cell lines. *Int J Tissue React.* 1998;20:101–7.
- [35] Lawen A. Apoptosis–an introduction. *Bioessays.* 2003;25:888–96.

- [36] Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:700–14.
- [37] Negrín G, Rubio S, Marrero MT, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. The eudesmanolide tanapsin from *Tanacetum oshanahanii* and its acetate induce cell death in human tumor cells through a mechanism dependent on reactive oxygen species. *Phytomedicine*. 2015;22:385-93.
- [38] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases—an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008;151:10–27.
- [39] Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817–829.
- [40] Yi CH, Yuan J. The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Dev Cell*. 2009;16:21–34.
- [41] Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641–52.
- [42] Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev* 1994;8:1613–26.
- [43] Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally downregulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:1155–61.
- [44] Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, Fischer H, Tschachler E. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol* 2008;25:831–41.
- [45] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008656.
- [46] Hoste E, Kemperman P, Devos M, Denecker G, Kezic S, Yau N, Gilbert B, Lippens S, De Groote P, Roelandt R, Van Damme P, Gevaert K, Presland RB, Takahara H, Puppels G, Caspers P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *J Invest Dermatol* 2011;131:2233–41.

- [47] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27:6194–206.
- [48] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205–19.
- [49] Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 2003;88:85–90.
- [50] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:897–907.
- [51] Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998;17:1675–87.
- [52] Jung JY, Lee SR, Kim S, Chi SW, Bae KH, Park BC, Kim JH, Park SG. Identification of novel binding partners for caspase-6 using a proteomic approach. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24:714–8.
- [53] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231–41.
- [54] Tor YS, Yazan LS, Foo JB, Wibowo A, Ismail N, Cheah YK, Abdullah R, Ismail M, Ismail IS, Yeap SK. Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells via Oxidative Stress Generation, Mitochondria-Dependent and Caspase-Independent Pathway by Ethyl Acetate Extract of *Dillenia suffruticosa* and Its Chemical Profile. *PLoS One*. 2015;10:e0127441.
- [55] van Loo G, Saelens X, van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*. 2002;9:1031–1042.
- [56] Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23:2861–74.
- [57] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:49–63.
- [58] Scoltock AB, Cidlowski JA. Activation of intrinsic and extrinsic pathways in apoptotic signaling during UV-C-induced death of Jurkat cells: the role of caspase inhibition. *Exp Cell Res*. 2004;297:212–23.

- [59] Burmistrova O, Marrero MT, Estévez S, Welsch I, Brouard I, Quintana J, Estévez F. Synthesis and effects on cell viability of flavonols and 3–methyl ether derivatives on human leukemia cells. *Eur J Med Chem.* 2014;84:30–41.
- [60] Wood DE, Newcomb EW. Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res.* 2000;256:375–82.
- [61] Ben Safta T, Ziani L, Favre L, Lamendour L, Gros G, Mami–Chouaib F, Martinvalet D, Chouaib S, Thiery J. Granzyme B–activated p53 interacts with Bcl–2 to promote cytotoxic lymphocyte–mediated apoptosis. *J Immunol.* 2015;194:418–28.
- [62] Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl–2 family members to control cell death. *J Clin Invest.* 2005;115:2648–55.
- [63] Chattopadhyay A, Chiang CW, Yang E. BAD/BCL–[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene.* 2001;20:4507–18.
- [64] Müller H, Helin K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1470(1):M1–12.
- [65] Pavletich NP. Mechanisms of cyclin–dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 1999;287:821–8.
- [66] Schnerch D, Yalcintepe J, Schmidts A, Becker H, Follo M, Engelhardt M, Wäsch R. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res.* 2012;2:508–28.
- [67] Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* 2000;96:73–92.
- [68] Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA–MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin–dependent kinases and associated cyclins. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1055–64.
- [69] Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin–dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1205–15.
- [70] Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37:2478–503.
- [71] Aoyama K, Nakaki T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules.* 2015;20:8742–58.

- [72] Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30:1191–212.
- [73] Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut.* 2003;52:144–51.
- [74] Liu WH, Chen YJ, Cheng TL, Lin SR, Chang LS. Cross talk between p38^{MAPK} and ERK is mediated through MAPK-mediated protein phosphatase 2A catalytic subunit α and MAPK phosphatase-1 expression in human leukemia U937 cells. *Cell Signal.* 2013;25:1845–51.
- [75] Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis.* 2007;28:2105–13.
- [76] Lee JT Jr, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia.* 2002;16:486–507.
- [77] Cabrera J, Quintana J, Reiter RJ, Loro J, Cabrera F, Estévez F. Melatonin prevents apoptosis and enhances HSP27 mRNA expression induced by heat shock in HL-60 cells: possible involvement of the MT2 receptor. *J Pineal Res.* 2003;35:231-8.
- [78] Burmistrova O, Quintana J, Díaz JG, Estévez F. Astragalin heptaacetate-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway. *Cancer Lett.* 2011;309:71-7.
- [79] Torres F, Quintana J, Díaz JG, Carmona AJ, Estévez F. Trifolin acetate-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspase-6 and activates the MAPK pathway. *Apoptosis.* 2008;13:716-28.
- [80] Rivero A, Quintana J, Eiroa JL, López M, Triana J, Bermejo J, Estévez F. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 2003; 482:77-84.
- [81] Liu X, Ye F, Wu J, How B, Li W, Zhang DY. Signaling proteins and pathways affected by flavonoids in leukemia cells. *Nutr Cancer* 2015;67:238–49.
- [82] Sak K, Everaus H. Chemomodulating Effects of Flavonoids in Human Leukemia Cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15:1112–26.
- [83] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:3670–95.

- [84] Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*. 1993;81:3091–6.
- [85] Marrero MT, Estévez S, Negrín G, Quintana J, López M, Pérez FJ, Triana J, León F, Estévez F. Ayanin diacetate-induced cell death is amplified by TRAIL in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;428:116–20.
- [86] Ray S, Bullock G, Nuñez G, Tang C, Ibrado AM, Huang Y, Bhalla K. Enforced expression of Bcl-XS induces differentiation and sensitizes chronic myelogenous leukemia–blast crisis K562 cells to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-mediated differentiation and apoptosis. *Cell Growth Differ*. 1996;7:1617–23.
- [87] Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol*. 2007;17:354–62.
- [88] Nicolini F, Burmistrova O, Marrero MT, Torres F, Hernández C, Quintana J, Estévez F. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. *Mol Carcinog*. 2014;53:939–50.
- [89] Kluza J, Gallego MA, Loyens A, Beauvillain JC, Sousa-Faro JM, Cuevas C, Marchetti P, Bailly C. Cancer cell mitochondria are direct proapoptotic targets for the marine antitumor drug lamellarin D. *Cancer Res*. 2006;66:3177–87.
- [90] Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J*. 1999;339:729–36.
- [91] Overmeyer JH, Kaul A, Johnson EE, Maltese WA. Active ras triggers death in glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis. *Mol Cancer Res*. 2008;6:965–77.
- [92] Guan JJ, Zhang XD, Sun W, Qi L, Wu JC, Qin ZH. DRAM1 regulates apoptosis through increasing protein levels and lysosomal localization of BAX. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1624.
- [93] Liu Q, Hofmann PA. Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H2204–12.
- [94] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:537–49.

- [95] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:3525-44.
- [96] Park HY, Kim GY, Kwon TK, Hwang HJ, Kim ND, Yoo YH, Choi YH. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by 7, 8-dihydroxyflavone hydrate through modulation of the Bcl-2 family of proteins and the MAPKs signaling pathway. *Mutat Res.* 2013;751:101-8.
- [97] Burmistrova O, Simões MF, Rijo P, Quintana J, Bermejo J, Estévez F. Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. *J Nat Prod.* 2013;76:1413-23.
- [98] Gong K, Xie J, Yi H, Li W. CS055 (Chidamide/HBI-8000), a novel histone deacetylase inhibitor, induces G1 arrest, ROS-dependent apoptosis and differentiation in human leukaemia cells. *Biochem J.* 2012;443:735-46.
- [99] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:579-91.
- [100] Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-60.
- [101] McClain DE, Kalinich JF, Ramakrishnan N. Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes. *FASEB J.* 1995;9:1345-54.
- [102] Wu TW, Hashimoto N, Wu J, Carey D, Li RK, Mickle DA, Weisel RD. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochem Cell Biol.* 1990;68:1189-94.
- [103] Cross AR. Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: mechanisms of action and methods for their elucidation. *Free Radic Biol Med.* 1990;8:71-93.

ANEXOS

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS:

Autores: **Mercedes Said Quintana**, I. Brouard, J. Quintana and F. Estévez

Título: Apoptosis induction by 3',4'-dibenzoyloxyflavonol in leukemia cells

Congreso: 40th FEBS CONGRESS. The Biochemical Basis of Life

Participación: Póster

Lugar: Berlín (Alemania)

Fecha: 2015

Publicación: FEBS Journal **282** (Suppl. 1) 365 (2015)

Autores: **Mercedes Said Quintana**, I. Brouard, J. Quintana y F. Estévez

Título: Síntesis y Actividad antiproliferativa de Chalconas y Flavonoles en

Células que Sobre-expresan Bcl-2 y Resistentes a Adriamicina

Congreso: XIX Semana Científica "Antonio González"

Participación: Póster

Lugar: Tenerife (España)

Fecha: 2015
