

## NUEVOS COMPUESTOS ANTILEUCÉMICOS

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que están omnipresentes en las plantas y muestran un amplio espectro de actividades biológicas. Aquí hemos estudiado el efecto del derivado tetraacetilado (QD) del producto natural 3 metil éter quercetina, sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de leucemia humana HL-60 y U937. Los resultados muestran que QD es citotóxico e induce parada en la fase G<sub>2</sub>-M del ciclo celular en ambas líneas celulares y es un potente inductor de la apoptosis. La apoptosis inducida por QD (i) es mediada por la activación de las caspasas, (ii) está asociada con la liberación del citocromo c y (iii) es activada en células U937 que sobreexpresan bcl-2. El tratamiento de células HL-60 y U937 con QD provoca la activación de la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), incluyendo JNK, p38 MAPK y ERK 1/2. La inhibición de JNK mediante el SP600125 y de p38 MAPK mediante SB203580 no tiene influencia en la apoptosis mediada por QD. Por el contrario, la inhibición de ERK 1/2 con inhibidores farmacológicos U0126 o PD98059 potenció el porcentaje de apoptosis inducida por QD y sugiere que la inhibición de esta vía es una estrategia valiosa para aumentar la sensibilidad de células de leucemia humana HL-60 hacia la QD.

S. Rubio  
J. Quintana  
J. L. Eiroa  
J. Triana  
F. Estévez

*Flavonoids are polyphenolic compounds that are ubiquitously in plants and display a vast array of biological activities. Here we have studied the effect of the phenylbenzo-gamma-pyrone derivative quercetin 3-methyl ether tetracetate (QD), obtained by acetylation of the natural product quercetin 3-methyl ether, on cell viability of human leukaemia HL-60 and U937 cell lines.*

*The results show that QD is cytotoxic and induce G<sub>2</sub>/M phase cell cycle arrest on both cell lines and it is a potent apoptotic inducer on HL-60 cells. QD-induced apoptosis is: 1) mediated by caspase activation 2) associated with cytochrome c release, and 3) triggered in Bcl-2-overexpressing U937 cells. The treatment of HL-60 and U937 cells with QD also induces the activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathway, including c-Jun NH (2)-terminal kinase (JNK), p38 (MAPK) and extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2. Inhibition of JNK by SP600125 and of p38 (MAPK) by SB203580 had no influence on QD-mediated apoptosis. In contrast, inhibition of ERK1/2 with the pharmacologic inhibitors U0126 or PD98059, together with QD, resulted in an important enhancement of apoptosis. Cells are sensitized to QD-mediated apoptosis after blocking ERK1/2, which suggests that inhibition of this pathway is a valuable strategy in order to increase the sensitivity of human leukaemia HL-60 cells towards QD.*

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años la utilización de agentes naturales para prevenir la aparición o el desarrollo del cáncer ha sido ampliamente aceptada como una opción realista en la lucha con-

tra esta enfermedad. Los flavonoides son derivados de la fenil benzo-γ-pirona y abarcan una amplia variedad de compuestos polifenólicos que aparecen de forma natural en las plantas (1). Los flavonoides están omnipresentes en los alimentos y be-

**Los compuestos polifenólicos muestran un gran espectro de actividades biológicas y se encuentran entre los agentes antitumorales más prometedores**

bidas a base de vegetales y, por tanto, son consumidos en cantidad significativa en nuestra dieta diaria (2). Estos compuestos polifenólicos muestran un gran espectro de actividades biológicas y están entre los agentes anticancerígenos más prometedores (3). La quercetina (3,3', 4', 5,7-pentahidroxi-flavona) es uno de los bioflavonoides mejor estudiados y se encuentra presente ampliamente en la naturaleza. Este compuesto potencia la acción citotóxica del citosín-arabinósido (ara-C) (4) e inhibe la invasión celular e induce la apoptosis (5). La apoptosis juega un papel crucial en el desarrollo normal de los organismos, en la homeostasis y en la defensa contra los patógenos. La mayoría de los fármacos que se utilizan en quimioterapia desencadenan esta clase de muerte celular en células de leucemia (6-8).

Las caspasas son las ejecutoras esenciales de apoptosis y constituyen una familia de las cisteinil-aspartato proteasas (9). Son generalmente sintetizadas como pro-enzimas o zimógenos (inactivos), los cuales son activados mediante hidrólisis proteolítica. Las caspasas apoptóticas se clasifican en iniciadoras o ejecutoras, dependiendo de la función que desempeñen en la cascada apoptótica. Las caspasas iniciadoras son las primeras en ser activadas y constituyen la primera etapa de una cascada mínima de dos pasos para activar las caspasas ejecutoras. Se han descrito dos vías de activación de las caspasas durante la apoptosis (10). La vía extrínseca requiere receptores de muerte, tales como Fas o los receptores del factor de necrosis tumoral (11), y promueve la activación de la caspasa-8 que, a su vez, activa mediante proteólisis a las caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7). En la vía intrínseca, ocurre la translocación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma que a su vez promueve la activación de caspasa-3, que es la responsable de hidrolizar proteínas celulares específicas durante la apoptosis (12). Sin embargo, la apoptosis

puede estar mediada no sólo por la vía de receptores de muerte (vía extrínseca) y por la vía mitocondrial (vía intrínseca), sino también, por la vía de señalización del retículo endoplasmático (13). Además, la apoptosis puede incluso tener lugar con independencia de la activación de las caspasas (14).

La respuesta celular a la apoptosis inducida por agentes químicos está asociada a la inactivación de las proteínas quinasas implicadas en la supervivencia celular y a la activación de las proteínas quinasas que promueven la apoptosis. Uno de los aspectos más importantes de la regulación de la apoptosis es que requiere proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Las MAPKs son una familia de Ser/Thr quinasas que actúan como mediadores extracelulares en respuesta a diversos estímulos (15) y que se activan por fosforilación de residuos de treonina y de tirosina (16). Hasta la fecha, al menos tres MAPKs importantes han sido identificadas: JNKs/SAPKs, p38 MAPK y ERK 1/2. Las ERK son principalmente activadas por factores de crecimiento y participan en la regulación de la mitogénesis (17, 18). Por otra parte, la JNK y las P-38 son activadas principalmente por estímulos citotóxicos y están asociadas fundamentalmente con la apoptosis. No obstante, existen múltiples excepciones a esta regla.

La activación de ERK puede desencadenar tanto efectos anti-apoptóticos como pro-apoptóticos, dependiendo del estímulo y del tipo de célula. Las JNK/SAPK se activan preferentemente por los estímulos de estrés, incluyendo la radiación UV, la hipertermia, las citoquinas inflamatorias, los agentes quimioterapéuticos y los inhibidores de la transcripción del RNA (anisomicina y la cicloheximida). La activación de la P-38 está relacionada con la respuesta celular frente al choque osmótico, el estrés fisiológico, la radiación UV y el tratamiento con agentes quimioterapéuticos (19).



tectaron mediante microscopía fluorescente (gráfica 2B). El análisis por citometría de flujo (gráfica 2C) muestra que el porcentaje de células apoptóticas (hipodiploides) aumentó seis veces en células HL-60 tratadas con QD (gráfica 2D). Aunque el crecimiento de las células U937 disminuyó (gráfica 1B), se obtuvo un índice menor de inducción a la apoptosis en comparación con las HL-60 como se muestra en los experimentos de citometría de flujo (gráfica 2D). Además, el pretratamiento con actinomicina D o cicloheximida en células HL-60 a concentraciones que inhiben la biosíntesis de ARN-m y de proteínas respectivamente, (23) no afecta a la respuesta apoptótica inducida por QD (gráfica 2E).

Para evaluar si la inhibición del crecimiento inducido por QD está mediada por alteraciones en la progresión del ciclo celular, evaluamos el efecto de este compuesto en la distribución de las distintas fases del

ciclo celular mediante estudios de citometría de flujo.

Como se muestra en la tabla 1, y en consonancia con los efectos inhibidores del crecimiento, QD indujo acumulación de células en la fase G2-M a expensas de la población de células en la fase G1, en células HL-60 y U937.

### **La muerte celular inducida por QD está mediada por la vía caspasa-dependiente**

Para determinar si las caspasas están involucradas, examinamos si QD induce hidrólisis de PARP, marcador apoptótico que indica activación de las caspasas (gráfica 3A). La hidrólisis de la proteína 116 kDa PARP fragmentada a 85 kDa fue detectada en células tratadas con QD después de haber sido expuestas durante 12 horas a una concentración tan baja como 3 µM, incrementándose de forma dosis-dependiente. Para averiguar si hay liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol durante la apoptosis inducida por la QD en células de HL-60, los preparados citosólicos fueron analizados por inmunoblot. Como se observa en la gráfica 3B, se detectó un incremento significativo en la cantidad total de citocromo c citosólico a las de 12 horas de tratamiento.

Así mismo, estudiamos el efecto de QD sobre el procesamiento de las caspasas. Con este propósito tratamos a las células HL-60 y U937 con concentraciones crecientes de QD (3-10µM) y diferentes tiempos, y las caspasas iniciadoras (caspasa-9 y caspasa-8) y ejecutoras (caspasa-7, -6 y -3) se determinaron por inmunoblot usando anticuerpos que se unen tanto a los proenzimas (precursores de las caspasas) como a los fragmentos activados. Primero analizamos el efecto de este compuesto en la formación de caspasa-9. El resultado muestra que QD estimula la hidrólisis de procaspasa-9 (inactiva) en los correspondientes fragmentos activos

		% SubG1	%G1	%S	G2-M
HL-60	12h Control	4,7 ± 0,1	52,8 ± 0,1	14,4 ± 0,5	28,4 ± 0,7
	12h QD	15,1 ± 2,8	21,9 ± 0,6	18,0 ± 0,7	45,8 ± 2,0
	24h Control	3,3 ± 0,2	54,8 ± 0,9	22,6 ± 0,0	20,8 ± 1,1
	24h QD	30,6 ± 0,2	11,7 ± 0,1	11,6 ± 0,1	44,7 ± 0,1
	48h Control	3,9 ± 0,2	55,6 ± 0,8	17,3 ± 0,2	22,4 ± 0,4
	48h QD	34,4 ± 2,8	21,2 ± 0,4	23,2 ± 1,1	12,4 ± 1,2
U937	12h Control	3,3 ± 0,4	55,9 ± 1,4	15,3 ± 0,1	26,1 ± 2,4
	12h QD	5,2 ± 0,2	30,8 ± 0,9	19,0 ± 0,4	46,1 ± 1,3
	24h Control	5,0 ± 0,5	59,9 ± 0,4	18,3 ± 0,7	17,8 ± 0,1
	24h QD	11,3 ± 0,4	29,8 ± 0,2	16,4 ± 0,1	42,4 ± 0,5
	48h Control	3,0 ± 0,4	54,1 ± 1,3	21,1 ± 0,4	22,7 ± 0,8
	48h QD	15,7 ± 0,7	31,2 ± 0,6	12,8 ± 1,0	38,9 ± 0,8

Tabla 1. Efecto de la QD en la distribución de las fases del ciclo celular en células HL-60 y U937 a diferentes tiempos

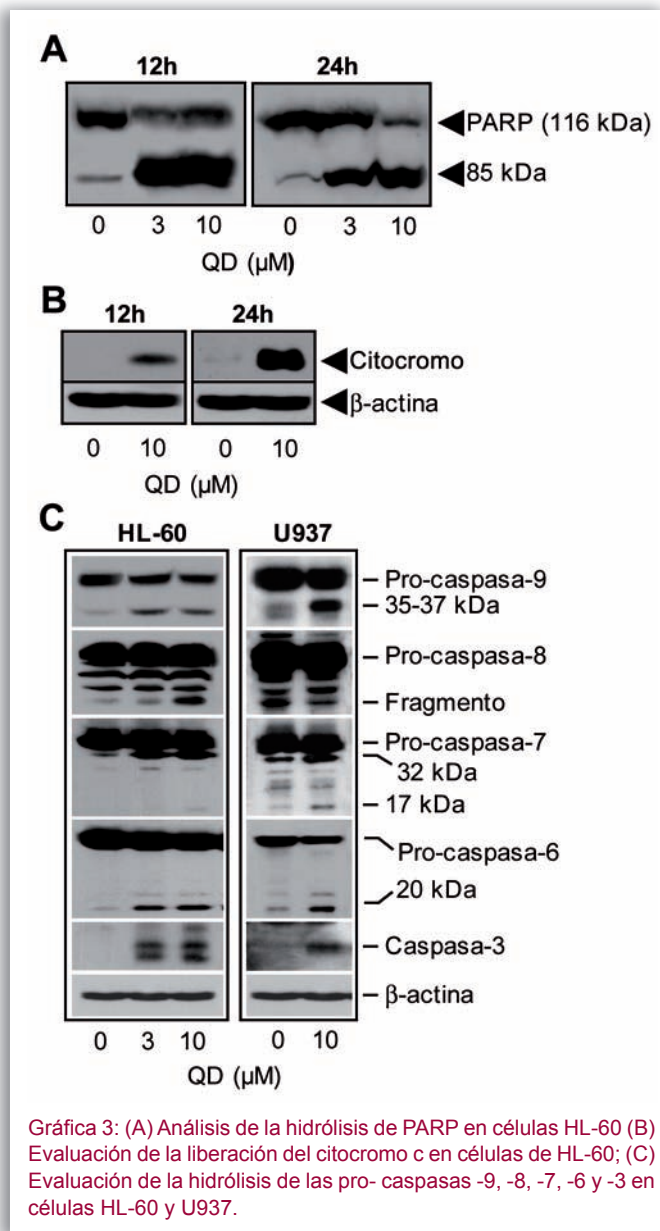
Se cultivan las células con QD a 10 µM a los periodos de tiempo mencionados y la distribución de la fase del ciclo celular fue determinada por citometría de flujo. Los valores representan la media ± SEs de dos experimentos independientes con resultados por duplicados en cada una. Los asteriscos indican una diferencia significativa (P < 0,05) en comparación con los controles correspondientes.

de 35-37kDa (gráfica 3C). En células U937 también se observó procesamiento de procaspasa-9 aunque se requirió un tratamiento de 24 horas (gráfica 3C).

Para determinar la contribución de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por QD, las células HL-60 se trataron con concentraciones crecientes de este compuesto y los lisados celulares se sometieron a análisis por inmunoblot. Los resultados demuestran que QD (10 $\mu$ M) induce de forma significativa la hidrólisis de la procaspasa-8, si bien esta respuesta no se detectó hasta las 24 horas de tratamiento (gráfica 3C). En cuanto a las células U937, no hubo hidrólisis de procaspasa-8 a los tiempos ensayados. Como se muestra en la figura 3C, QD estimula a su vez el procesamiento proteolítico de las caspasas ejecutoras -7, -6 y -3. En células HL-60, concentraciones bajas de QD (3  $\mu$ M) inducen la hidrólisis de las procaspsas -7, -6 y -3 a las 12 horas. Por el contrario, en células U937 se requieren concentraciones más altas (10 $\mu$ M) y tratamientos más prolongados (24 horas).

Para confirmar que la inducción de apoptosis por QD requiere de la activación de las caspasas, las células HL-60 se pretrataron con un inhibidor general de caspasas (z-VAD-fmk). La inhibición de la apoptosis inducida por QD en presencia de z-VAD-fmk demuestra que la apoptosis es caspasa dependiente.

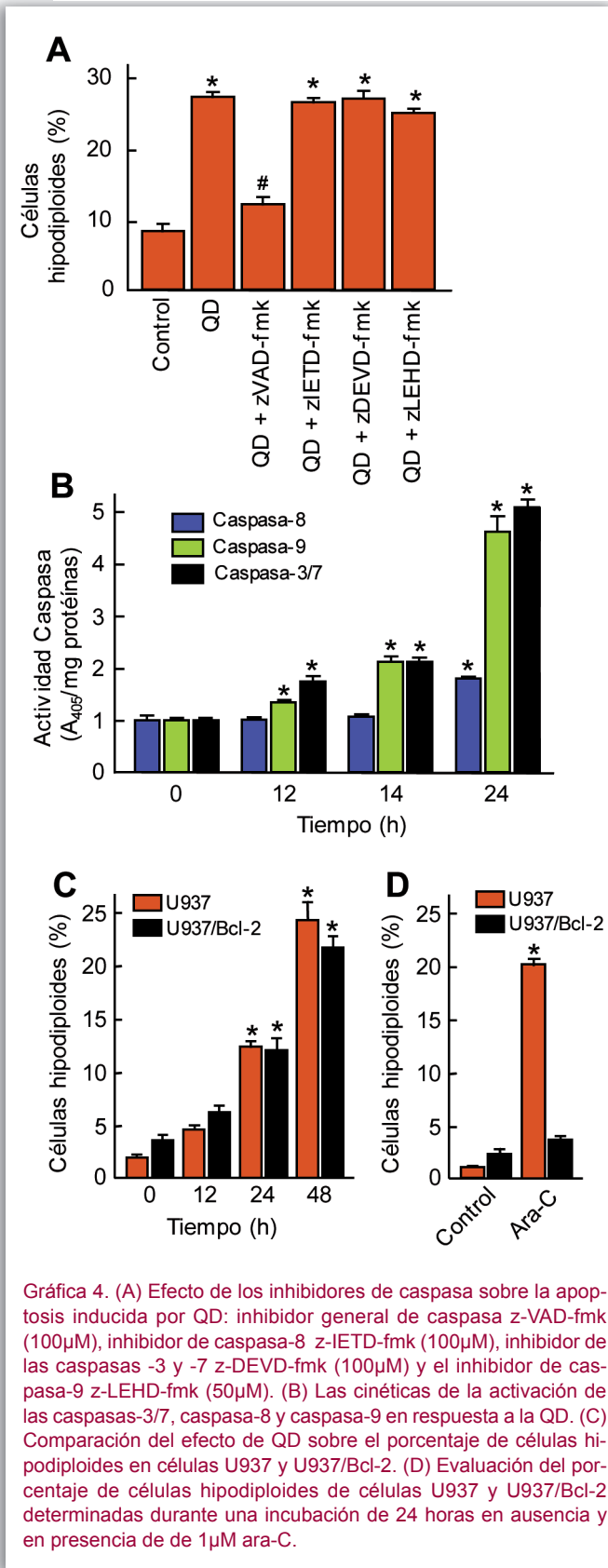
Para identificar qué caspasas son importantes en la apoptosis inducida por QD se estudió el efecto de los inhibidores permeables de caspasas. Ninguno de los inhibidores utilizados como z-IETD-fmk (inhibidor específico de caspasa-8), z-LEHD-fmk (inhibidor específico de la caspasa-9) o z-DEVD-fmk (inhibidor específico de las caspasas -3 y -7) tuvieron efecto significativo en la muerte celular inducida por QD (gráfica 4A). Sorprendentemente, el inhibidor específico de caspasa-3 (z-DEVD-fmk) fue in-



capaz de inhibir la apoptosis inducida por QD en células de HL-60. (Gráfica 4A). Este resultado sugiere que *in vivo* se requiere probablemente una segunda caspasa, posiblemente caspasa-6 (gráfica 3C), que es sensible a z-VAD-fmk, pero no a z-DEVD-fmk (26). Sin embargo, la caspasa-3 activa se encuentra presente en niveles altos en células HL-60 tratadas con QD (gráfica 3C).

Puesto que el procesamiento de las caspasas no siempre se corresponde con un aumento de la activi-

### La apoptosis inducida por QD es dependiente de caspasa



dad, las actividades enzimáticas de la caspasa-3 y de las caspasas -8 y -9 se determinaron en extractos de células HL-60 tratadas con QD a diferentes tiempos. Como se muestra en la gráfica 4B, las actividades de caspasas 3 y -9 aumentan significativamente a las 12-14 horas. Mientras que la actividad de la caspasa -8 se detectó a las 24 horas del tratamiento.

Para dilucidar si la vía intrínseca es determinante en la inducción de apoptosis por QD, comparamos los efectos en la inducción de apoptosis en la línea celular U937 que sobreexpresan bcl-2 (U937/bcl-2) con la línea celular parental (U937). Como se muestra en la gráfica 4C, no hay diferencias en la inducción de apoptosis a diferentes tiempos de tratamiento (12, 24 y 48 horas). Estos resultados sugieren que bcl-2 no está involucrado en la apoptosis inducida por QD.

#### QD activa a MAPKs

Puesto que las MAPKs como ERK, JNK/SAPK y p38 MAPK juegan un papel crucial en el destino de la célula, se evaluó el efecto de QD sobre la activación de MAPKs.

La incubación de células HL-60 y U937 con QD estimuló la fosforilación de JNK/SAPK, de p38 MAPK y de ERK 1/2 (gráficas 5 A y B). La fosforilación de p38 MAPK y de ERK 1/2 se detectó a los 30 minutos y a la hora de añadir QD, respectivamente, y ambos valores permanecieron elevados hasta al menos 240 minutos (gráfica 5A). Sin embargo, y en las mismas condiciones de experimentación, no se observó la activación de la JNK/SAPK hasta 4 horas después de añadir QD (gráfica 5B). Estos resultados indican que QD induce activación de JNK/SAPK, de p38 MAPK y de ERK 1/2 siguiendo diferentes cinéticas. Para establecer si la fosforilación de la MAPKs juega un papel esencial en la apoptosis inducida por QD, examinamos los efectos de los



duplicó el porcentaje de muerte celular respecto a las células tratadas con QD y aumentó diez veces respecto a U0126 (gráfica 5F). Estos resultados sugieren que los inhibidores específicos de ERK 1/2 pueden ser útiles para sensibilizar a las células leucémicas humanas frente a QD.

## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado los efectos del derivado tetracetil 3-metil éter de quercetina (QD) sobre la viabilidad celular en líneas celulares de leucemia humana. QD demostró ser citotóxico para las líneas celulares mieloides estudiadas: HL-60 y U937. Este compuesto indujo la parada en G2-M del ciclo celular y apoptosis independientemente de la biosíntesis de proteínas. Los resultados también demuestran que la apoptosis inducida por QD está mediada por la activación de las caspasas y asociada a la liberación de citocromo c. Además, el tratamiento de células humanas HL-60 y U937 con QD también induce la activación de las MAPKs (JNK/SAPK, p-38 MAPK y ERK 1/2). La inhibición de JNK mediante SP600125 y la inhibición de p38 MAPK por SB203580 no afectan a la apoptosis inducida por QD. Por el contrario, la inhibición del ERK 1/2 con los inhibidores U0126 o PD98059 potenció el efecto de QD sobre la apoptosis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Middleton.E., Kandaswami, C. and Theoharides,T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673-751.

2. Havsteen,B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.*, **96**, 67-202.

3. Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. and Zhang, L. (2003) Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, **23**, 519-534.

4. Teofili, L., Pierelli, L., Iovino, M.S., Leone, G., Scambia, G., De Vincenzo, R., Benedetti-Panici, P., Menicella, G., Macri, E., Piantelli, M., Ranelli, F.O. and Larocca, L.M. (1992). The combination of quercetin and cytosine arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth. *Leuk. Res.*, **16**, 497-503.

5. Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. and Uchida, A. (1994). Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res.*, **54**, 4952-4957.

6. Dive, C. and Hickman, J.A. (1991). Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br. J. Cancer*, **64**, 192-196.

7. Fisher, D.E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, **78**, 539-542.

8. Hickman, J.A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metast. Rev.*, **11**, 121-139.

9. Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.

10. Boatright, K.M. and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 725-731.





27. Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J. and Kroemer, G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.*, **6**, 516-524.

28. Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G., Liu, L. and Bhalla, K. (1996) Over-expression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human myelogenous leukaemia HL-60 cells. *Cancer Res.*, **56**, 4743-4748.

29. Cragg, G.M., Kingston, D.G.I. and Newman, D.J. (2005). *Anticancer Agents from Natural Products*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL.

30. Lee, W.R., Shen, S.C., Lin, H.Y., Hou, W.C., Yang, L.L. and Chen, Y.C. (2002). Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 225-236.

31. Beutler, J.A., Hamel, E., Vlietinck, A.J., Haemers, A., Rajan, P., Roitman, J.N., Cardellina, J.H. and Boyd, M.R. (1998). Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. *J. Med. Chem.*, **41**, 2333-2338.

32. Gupta, K. and Panda, D. (2002). Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry*, **41**, 13029-13038.

## BIOGRAFÍA

### SARA RUBIO SÁNCHEZ

Sara Rubio Sánchez es licenciada en Farmacia por la Universidad de Alcalá de Henares; cuenta con el Diploma de Estudios Avanzados (DEA) obtenido en el programa Clínica y Terapéutica, área Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Actualmente, realiza el doctorado en el Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, y su labor investigadora está centrada en el estudio de nuevos compuestos antileucémicos.

Últimos trabajos publicados:

Rubio S., Quintana J., Eiroa J.L., Triana J., Estévez F. (2007). Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukaemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis*. Vol 28: 2105-2113.

Rubio S., Estévez F., Cabrera J., Reiter R.J., Loro J., Quintana J. (2007). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal* vol 42:131-138.

Rubio S., Quintana J., López M., Eiroa J.L., Triana J., Estévez F. (2006). Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betulet derivatives as potential antitumoral agents. *Eur J Pharmacol*. Vol 548: 9-20.

Dpto. Bioquímica.  
C/ Dr.Louis Pasteur, s/n.  
CP 35016  
LPGC  
Srarubio101@yahoo.es

Patrocinador de esta investigación:

**CLÍNICA DE SAN ROQUE Y LA CAJA DE CANARIAS**