



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

FITOMETABOLITOS AISLADOS DE LA FLORA DEL SUR DEL ECUADOR CON
ACTIVIDAD CITOSTÁTICA Y/O CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
NATALIA CATALINA BAILON MOSCOSO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. MARIANO MARTÍNEZ VASQUEZ
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
DR. JAVIER JESÚS ESPINOSA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICA

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Secretario: Dra Martha Patricia Ostrosky Shejet (Secretario)

Vocal: Dr. Emilio Rojas Del Castillo

Vocal: Dra. María del Rocío Cruz Ortega

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Tutor: Dra. Patricia Ostrosky- Shejet

Sustentante: Bioquímica Natalia Catalina Bailón Moscoso

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer especialmente

A mi esposo por ser el amigo, el compañero, el impulso y el apoyo en todo momento para realizar y culminar el doctorado.

A mis padres y hermanos por enseñarme a perseverar y alcanzar las metas que se proponen.

A mi familia política por el apoyo constante.

Al Dr. Luis Miguel Romero por impulsarme a realizar el doctorado.

A la Dra. Patricia Ostrsoky, por compartir sus conocimientos y sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Mariano Martínez Vásquez, Al Dr. Javier Espinosa, al Dr. Alejandro Zentella y el Dr. Edward Ratovitski, por sus importantes aportes al desarrollo de este proyecto.

A los técnicos académicos Monserrat Sordo, Jose Luis Ventura e Irma Mitre, por su valiosa asistencia técnica.

A mis múltiples compañeros de laboratorios por su paciencia y comprensión.

A la Secretaría Educación Superior Ciencia e Innovación del Ecuador y Tecnología Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador por el apoyo económico otorgado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una oportunidad de formarme profesionalmente, pero que me permitió crecer en todos los aspectos de mi vida.

DEDICATORIA

A Juan Carlos, Carolina, y José Emilio

A mis padres y hermanos

INDICE GENERAL

	Página
Índice General	VI
Indice de Cuadros	VIII
Índice de figuras	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Fármacos desarrollados contra el cáncer a partir de las características de la célula tumoral	5
1.1.1 Producción de sus propias señales de crecimiento	7
1.1.2 Insensibilidad a las señales que detienen el crecimiento.	9
1.1.3 Resistencia a la muerte celular	11
1.1.4 Potencial ilimitado de replicación	18
1.1.5 Activación de la Invasión y Metástasis	22
1.1.6 Incremento de Angiogénesis	24
1.1.7 Inestabilidad genómica y mutaciones	28
1.1.8 Desregulación energética celular	32
1.1.9 Evasión del reconocimiento del sistema inmune	34

1.1.10 Inflamación promotora de tumores	37
1.2 Plantas medicinales de Ecuador con potencial anticáncer y su composición química	43
1.2.1 Especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada	44
1.2.2 Especies de origen ecuatoriano con potencial anticáncer	52
1.3 Ensayos de muerte celular para el descubrimiento de fármacos	60
1.3.1 Ensayos de identificación de tipo de muerte celular	64
1.3.2 Métodos para medir apoptosis	66
1.3.3 Ensayos de citostaticidad	69
1.3.4 Relación de la familia de p53 y citostaticidad y muerte celular	71
1.4 Genotoxicidad de los fármacos antineoplásicos	75
1.4.1 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)	76
1.4.2 Ensayo de electroforesis de célula única (Ensayo del Cometa)	78
2 OBJETIVOS	80
3 PARTE EXPERIMENTAL	81
3.1 Selección de especies vegetales	82
3.1.1 Recolección de las muestras	82
3.1.2 Preparación de los extractos	83
3.2 Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios	83
3.2.1 Procedimientos químicos generales	84
3.2.2 Caracterización e identificación de metabolitos secundarios	85

3.3 Tamizaje primario: Actividad inhibitoria del crecimiento celular	85
3.3.1 Disolución de los extractos	85
3.3.2 Líneas celulares	85
3.4 Determinación de la inhibición de la proliferación	86
3.4.1 Ensayo MTT y MTS	86
3.5 Caracterización del efecto antitumoral	86
3.5.1 Observación de cambios morfológicos celulares.	87
3.5.2 Índices mitóticos y de replicación	87
3.5.3 Análisis del ciclo celular	88
3.5.4 Ensayo clonogénico de las células <i>in vitro</i>	88
3.5.5 Ensayo de apoptosis (Anexina V-FITC/PI)	89
3.5.6 Análisis de transferencia de Westernblot	89
3.6 Evaluación de la actividad genotóxica en linfocitos humanos	90
4.6.1 Ensayo del cometa	91
4.6.2 Ensayo de micronúcleos Citocinesis-Block (CBMN).	92
4 RESULTADOS	95
4.1 <i>Oreopanax andreanus</i>	95
4.2 <i>Annona montana M.</i>	96
4.3 <i>Clusia latipes</i>	101
4.3.1 Actividad citotóxica de los extractos de <i>C. latipes</i> sobre líneas tumorales humanas	101

4.3.2 Aislamiento, caracterización e identificación de metabolitos secundarios de las hojas de <i>C. latipes</i>	102
4.3.3 Actividad genotóxica sobre linfocitos humanos del extracto hexánico de <i>C. latipes</i>	106
4.4 <i>Gynoxis verrucosa</i>	109
4.4.1 DhL modula la viabilidad celular de las células tumorales, especialmente de las células D384	110
4.4.2 DhL muestra el efecto citostático sobre las células D384 a través de la detención del ciclo celular y la apoptosis	115
4.4.3 DhL indujo la expresión de p73 total y la fosforilación de p73 y p53 en las células D384	119
4.4.4 DhL muestra las actividades citostáticos/genotóxicos en linfocitos humanos	122
5 DISCUSIÓN	128
6 CONCLUSIONES	131
7 PERSPECTIVAS	132
8 REFERENCIAS	134
9 ANEXOS	159

Publicación 1. Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumor Biology*, 35 (5), 3981-3995.

Publicación 2. Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., & Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, 24, 6, 2283-2296.

Publicación 3 Bailon-Moscoso N., González-Arévalo G., Velásquez-Rojas R., Malagon O, Vidari G., Zentella-Dehesa, A., Ratovitski E., & Ostrosky-Wegman P., (2015). Phytometabolite Dehydroleucodine Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Human Astrocytoma Cells through p73/p53 Regulation. *PLOS ONE* vol. 10 (8) p. e0136527.

Publicación 4 Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides J.C., Sordo M., Villacís J, Silva R. , Celi L, Martínez-Vázquez M., Ostrosky-Wegman P., (2014). Phytochemical study and evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia latipes* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Aceptado

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada	45
2	Recolección de especies usadas en el estudio	83
3	Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas a 50 μ g/mL del extracto de hojas de <i>Oreopanax andreauns</i>	94
4	Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas a 50 μ g/mL de extractos de <i>Annona montana</i>	96
5	Determinación del IC ₅₀ del extracto de <i>Annona montana</i> M (AcOEt)	97
6	Efecto genotóxico de diferentes dosis de extractos de <i>Annona montana</i> M extrae sobre linfocitos humanos en proliferación	98
7	Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas a 50 μ g/mL de los extractos de hojas de <i>Clusia latipes</i>	100
8	Efecto de daño en el ADN de diferentes dosis del extracto de hexáno de <i>Clusia latipes</i> en linfocitos humanos en proliferación	103
9	Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas al extracto de <i>Gynoxis verrucosa</i> y Dehidroleucodina	107

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Hitos de la célula tumoral.	6
2	Enfoque terapéutico de los hitos de la célula tumoral (Parte 1)	28
3	Enfoque terapéutico de los hitos de la célula tumoral (Parte 2)	42
4	Estructuras químicas aisladas de especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada	52
5	Estructuras químicas aisladas de especies de origen ecuatoriano con potencial anticáncer. Parte I. De la 13 a la 22	56
6	Estructuras químicas aisladas de especies de origen ecuatoriano con potencial anticáncer. Parte II. De la 23 a la 22	58
7	Familia de p53 y sus funciones	72
8	Inducción de Micronúcleos	77
9	Tipos de daños medidos mediante la versión alcalina del ensayo del cometa.	78
10	Estrategia experimental de trabajo.	81
11	Viabilidad de linfocitos humanos expuestos a 5, 15 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extractos de <i>A. montana</i> .	97
12	Genotoxicidad en los linfocitos humanos expuestos a 5, 15 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos de <i>A. montana</i> .	98
13	Metabolitos secundarios aislados de <i>C. latipes</i>	103
14	Efectos de citotoxicidad y genotoxicidad del extracto hexánico de	104

Clusia latipes

15	Porcentaje de viabilidad celular. D-384 expuestas a diferentes concentraciones de Dehidroleucodina	109
16	Cambios morfológicos de las células D-384 luego de 32 horas de exposición a Dehidroleucodina	110
17	Efectos citostáticos de la Dehidroleucodina	
18	Ciclo celular de las células D-384 expuestas a 32 horas a las distintas concentraciones de Dehidroleucodina	111
19	Apoptosis de las células D-384 detectada por Anexina V-FITC / PI.	112
20	Porcentaje de apoptosis de las células D-384 y Supervivencia celular	113
21	Expresión de proteínas en D-384 células tras la exposición de DhL	116
22	Viabilidad celular e índice de proliferación de linfocitos humanos expuestos a DHL	118
23	Efecto genotóxico en linfocitos humanos expuestos a DhL	119

RESUMEN

Actualmente, existen muchos tratamientos curativos y paliativos para el cáncer permitiendo erradicar las células tumorales; entre ellos se encuentran la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, e incluso la terapia génica. La quimioterapia, la aplicación de una serie de compuestos químicos, naturales o sintéticos, conducen a la inducción de la muerte celular o detención del ciclo celular en las células tumorales. Los metabolitos secundarios aislados de microorganismos, plantas y especies marinas, entre otros, han sido fuentes importantes de sustancias bioactivas contra el cáncer. La producción de metabolitos secundarios se ve favorecida por un microambiente diverso. En Ecuador hay aproximadamente 20.000 diferentes especies de plantas, de las cuales el 20% son endémicas. Ecuador continental es la región con la tercera mayor densidad de especies de plantas endémicas en todo el mundo. Otra característica importante del Ecuador es el conocimiento etnomédico de muchas comunidades indígenas. Para estudiar la actividad antitumoral y su potencial genotóxico, se seleccionaron: *Oreopanax andreanus*, *Annona montana*, *Clusia latipes*, *Gynoxys verrucosa* especies de la flora del sur de Ecuador. De los extractos evaluados, todos presentaron actividad genotóxica medidos por el ensayo cometa. Tres de las cuatro especies mostraron actividad antitumoral. Los diversos extractos orgánicos de la fruta de *A. montana* mostraron capacidad de inhibir la supervivencia de las células tumorales de diversas líneas celulares de cáncer. En este estudio, hemos examinado el efecto citotóxico de los extractos de

hexano, acetato de etilo de la hojas de *Clusia latipes*. Del extracto hexánico de *C. latipes* se aisló e identificó: friedelina, friedolan-3-ol, β -amirina y hesperidina.

En este estudio, hemos demostrado que una lactona, la dehidroleucodina (DhL) aislada de *Gynoxys verrucosa* muestra las actividades de citostáticos y citotóxicos sobre la línea celular cerebral humana D384 astrocitoma. Se encontró que la DhL indujo la muerte celular en células D384 a través de la activación de la detención del ciclo celular, inducción de la apoptosis, y daño en el ADN evaluada por ensayos basados en células. En la muerte celular aumentó la expresión de las proteínas CDKN1A y BAX. Aunque DhL marcadamente indujo los niveles de proteínas de TP73 total y TP53 fosforilada, γ -H2AX, mientras que no hubo aumento en el nivel total de TP53 en células D384 tras la exposición a la DhL. En general, estos estudios demostraron el efecto negativo marcado de DhL sobre la supervivencia de células de astrocitoma humanas a través de la expresión inducida de TP73 y la fosforilación de TP73 y TP53 sugiriendo su papel clave en la respuesta de las células del tumor al tratamiento DhL.

ABSTRACT

Currently, there are many curative and palliative treatments for cancer that eradicate tumor cells, including chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy, and even gene therapy. During chemotherapy, the application of a series of chemical compounds, either natural or synthetic compounds, leads to induction of cell death or cell cycle arrest in tumor cells. Secondary metabolites isolated from microorganisms, plants, and marine species, among others, have been important sources of bioactive substances with potential anticancer properties. The production of secondary metabolites is favored by a diverse microenvironment. There are approximately 20,000 various plant species, 20% of which are endemic, found in Ecuador. Continental Ecuador is the region with the third-highest density of endemic plant species worldwide and many indigenous communities with significant ethnomedical knowledge. This work selected the *Oreopanax andreanus*, *Annona montana*, *Clusia latipes*, and *Gynoxys verrucosa* plant species of southern Ecuador to study the antitumor activity and genotoxic potential of their secondary metabolites. Extracts from these plants were evaluated for their genotoxic effects; all were genotoxic, as assessed by the comet assay. Three of the four species showed antitumor activity. The various organic extracts of the *A. montana* fruit inhibited tumor cell survival in various cancer cell lines. In this study, we examined the cytotoxic effects of hexane, ethyl acetate, and methanol extracts from *C. latipes* leaves. Chromatographic purification of the *C. latipes* hexane extract led to isolation and identification of friedelin, friedolan-3-ol, and hesperidin as active

cytostatic/genotoxic compounds in the hexane extract, while β -amyrine was identified as an active cytostatic compound in the ethyl acetate extract of *C. latipes*.

In this study, we showed that dehydroleucodine (DhL) isolated from *G. verrucosa* was cytostatic and cytotoxic toward the human cerebral astrocytoma D384 cell line. We found that the DhL induced cell death in D384 cells through triggering cell cycle arrest, induction of apoptosis, and DNA damage, as assessed by cell-based assays. We further found that the cell death program implicated the increasing expression of CDKN1A and BAX proteins. Although DhL markedly induced expression of total TP73 and phosphorylated TP53, TP73, and γ -H2AX proteins, there was no increase in the total level of TP53 in D384 cells after DhL exposure. Overall, these studies demonstrated the marked negative effect of DhL on the survival of human astrocytoma cells through induced expression of TP73 and phosphorylation of TP73 and TP53, suggesting their key roles in the tumor cell response to DhL treatment.

1 INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes esfuerzos realizados a nivel mundial en la búsqueda de fármacos para el tratamiento del cáncer, sólo algunos de ellos pueden ser catalogados como exitosos, como en el caso de imatinib para la leucemia mieloide crónica (LMC); el trastuzumab para cáncer de mama con amplificación de ERBB2 así como el erlotinib y el gefitinib para cánceres de pulmón en los que se expresan mutaciones en el factor de crecimiento epitelial (EGFR) [1, 2].

Probablemente la dificultad para obtener fármacos efectivos radica en la complejidad de las células del cáncer, el microambiente tumoral y sus semejanzas con las células normales. Hace más de 50 años, la estrategia de búsqueda de fármacos, estaba basada en el hecho de que las células tumorales se replican más rápido que las células normales, ya que la división celular tiene como molécula central el DNA. Debido a ello, tienen este blanco terapéutico: la gran mayoría de los fármacos utilizados en la actualidad provocan daño en el DNA, se interrumpe la división y posteriormente se produce la muerte celular.

Sin embargo, los avances en el conocimiento hoy en día sobre biología molecular y la genética de las células tumorales además del desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas como metodológicas han permitido la identificación tanto de nuevos blancos terapéuticos como de moléculas con actividad farmacológica más específica, y a la vez entender sus mecanismos de acción. En este proceso de descubrimiento de fármacos existe un interactivo ciclo en el que actúan la síntesis química y la evaluación biológica.

1.1 Fármacos desarrollados contra el cáncer a partir de las características de la célula tumoral



Figura 1. Hitos de la célula tumoral. Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011

En el 2002 Hanahan y Weinberg describieron seis capacidades distintivas y complementarias de las células del cáncer que permiten el crecimiento del tumor y la difusión metástasis [3], sin embargo en el 2011, los mismos autores describieron cuatro características más, que incluyen características distintivas y de interacciones de señalización del microambiente tumoral [4] (Figura 1).

A continuación se describirán las estrategias terapéuticas desarrolladas de acuerdo a estas diez capacidades distintivas, ejemplos de los blancos moleculares y probables fármacos relacionados con estas características de las células tumorales se observan en las Figuras 2 y 3.

1.1.1 Producción de sus propias señales de crecimiento

Las células cancerosas proliferan incluso en ausencia de señales de estimulación a diferencia de las células normales que necesitan ciertos factores (los cuales generalmente son producidos por las células vecinas) que les permiten pasar de un estado de reposo a un estado de proliferación activa.

Muchos de estos factores en las células tumorales se deben a las señales imitadas por los oncogenes, los cuales están involucrados en la gran mayoría de las vías de señalización celular como es el caso de la ruta PI3K-Akt, la cual promueve el crecimiento y la proliferación celular, así como la supervivencia y la migración [5].

Las enzimas Fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3K) conforman una familia de tipo lípido-quinasas que catalizan la activación de mTOR; el cual integra muchas señales, incluyendo la señalización de los factores de crecimiento, el estado de energía de la célula, nutrientes y disponibilidad de O₂ [6]. Desde el punto de vista terapéutico, la adecuada regulación de mTOR impide la división celular, de allí que se han desarrollado inhibidores capaces de bloquear directamente a las PI3K pero además a mTOR, (ya que estructuralmente son similares debido a que ambos poseen una subunidad p110). La principal ventaja de estos inhibidores

es el hecho de que actúan también sobre algunas de las isoformas de PI3K y de todas las isoformas hasta la fecha conocidas de mTORC1 y mTORC2. Inhibidores duales de PI3K/mTOR recientemente desarrollados incluyen NVP-BEZ235, BGT226, XL765/SAR245409, SF1126, GDC-0980, PI-103, PF-04691502, PKI-587 y GSK2126458. Esta inhibición de la función biológica de PI3K/mTOR ha demostrado la posibilidad de bloquear potentemente la proliferación en un amplio panel de líneas de células tumorales a través de inducir la detención en G1 [7, 8].

Otra de las vías de señalización y regulación del crecimiento celular es la regulada por c-MYC. La familia MYC cumple un papel crucial tanto en el desarrollo embrionario como en el oncogénico: en los tejidos normales, MYC es un factor de transcripción de genes de la proliferación celular, sin embargo una vez que en el desarrollo oncogénico del gen, MYC se encuentra desregulado, los genes diana de MYC están involucrados en el crecimiento celular y la evasión de apoptosis e incluso en la resistencia a la quimioterapia [9]. A partir de finales de los años 70 se ha considerado como blanco terapéutico la inhibición de la función MYC, no obstante el que sea un factor de transcripción no ha hecho fácil la obtención de fármacos [10]. Desde hace poco se plantearon inhibidores del RNA mensajero de MYC, los cuales se pueden agrupar en dos tipos: 1) moléculas antisentido de RNA, que actúan en contra del mensajero bloqueando su traducción; y 2) derivados del ácido retinoico, los cuales disminuyen la tasa de proliferación [11]. El ácido retinoico, un metabolito de la vitamina A, produce una disminución de las células en crecimiento debido a que las detienen en la fase

G1 del ciclo celular e induce a la diferenciación en algunas líneas celulares como neuroblastoma [12], similares efectos se han observado *in vivo* [13].

c-Myc actúa como factor de transcripción uniéndose al DNA, esta unión es dependiente de los bromodominios en la cromatina [en el 2010 se informó que un tieno-triazol-1,4-diazepin (JQ1)], que es capaz de desplazar por unión competitiva a los bromodominios (BET), disminuyendo la actividad de MYC [14].

En el mieloma múltiple, donde MYC juega un papel importante en el desarrollo del tumor, se ha demostrado que JQ1 presenta sinergismo con determinados agentes apoptóticos produciendo una mayor muerte celular [15], por lo que este tipo de moléculas podrían ser importantes en la terapéutica de las neoplasias de tipo hematopoyéticas [16].

Otras de las rutas relacionadas con la proliferación celular que frecuentemente se encuentra alterada en el caso de las células tumorales es la vía de ERBB y VEGF, las cuales también están relacionadas con la angiogénesis y la invasión y metástasis, por lo que revisaremos algunos fármacos contra estas dianas más adelante.

1.1.2 Insensibilidad a las señales que detienen el crecimiento.

Las señales que bloquean el crecimiento pueden evitar la proliferación por dos mecanismos distintos: 1) forzando a las células a salir del ciclo de proliferación activo y entrar en el estado de reposo (quiascente), o 2) obligando a las células a

renunciar definitivamente a su potencial de proliferación al entrar en estado postmitótico [17].

El ciclo celular es regulado entre otras moléculas, por la expresión de ciclinas dependientes de cinasas (CDKS) y proteínas miembros de la familia retinoblastoma (RB, RB1, RBL1, RBL2) [18]. En la transición de la fase G1 a la S, estímulos de tipo mitogénico inducen la liberación de CDKs; CDK4 conjuntamente con CDK6, los cuales inician la fosforilación de RB1, RBL1 y RBL2, conduciendo a un cambio irreversible hacia la fase S, de manera similar está regulado el paso de la fase G0 a G1 [19]. La proteína retinoblastoma (RB) ha sido implicada en muchos procesos celulares, como la regulación del ciclo celular, la respuesta al daño del ADN, la reparación del ADN, la replicación del ADN, la protección contra la apoptosis y la diferenciación, todo en lo cual podría contribuir a su función como supresor de tumores [20].

Por lo general en el cáncer, las células evaden las señales proporcionadas por RB, sea por mutación en sus genes o por una sobre-expresión de las ciclinas. Las ciclinas, dentro de su estructura contienen un surco hidrofóbico, que es reconocido por RB1, RBL1 y otros numerosos sustratos del ciclo celular, como por ejemplo, p53, factores de transcripción, E2F y proteínas endógenas inhibitoras como p27 y p21; todos estos sustratos contienen regiones de tipo 'KXL o RXL' (Arg/Lys-X-Leu). Basado en ello se han desarrollado moléculas pequeñas que se unen a las regiones RXL o KXL e inducen apoptosis en células tumorales o inhiben el crecimiento tumoral in vivo [21]. Existen más de quince fármacos inhibidores de las ciclinas en etapa de evaluación en fase I y II, dentro de los cuales podemos destacar el flavopiridol, que es un inhibidor de CDK1,

CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 y CDK9, ha demostrado ser eficaz en pacientes con leucemia linfocítica crónica en recaída y renuentes [22], además se ha probado en pacientes solo y combinado con otros agentes citotóxicos y los resultados han sido alentadores [23].

Otra opción es bloquear las señales de crecimiento mediante la restauración de las funciones de los genes supresores como el caso de Rb, para lo cual se ha desarrollado un péptido de 39 aminoácidos derivado de una región espaciadora de RBL2, denominado SPA310, que tiene la capacidad de retener las señales inhibitorias de CDK2 y detiene el ciclo celular, tanto *in vitro* como *in vivo* [24].

1.1.3 Resistencia a la muerte celular

La apoptosis es un mecanismo celular controlado, mediante el cual el organismo mantiene la homeostasis celular del tejido normal eliminando las células dañadas [25]; sin embargo a pesar de que las células tumorales acumulan diversos daños, no se induce la apoptosis. Esta característica ha sido una de las más estudiadas [26] y es hasta la época en la que mayores blancos moleculares, se han planteado así como fármacos desarrollados. Sin embargo hay que recalcar que aunque muchos de los fármacos producen como resultado final la muerte por apoptosis, en este apartado revisaremos únicamente aquellos que actúan sobre las vías y moléculas relacionadas directamente con el proceso apoptótico como tal. Existen dos principales vías de señalización de la apoptosis en células de mamíferos: la vía extrínseca y la vía intrínseca [27]. La vía extrínseca se inicia a través de los receptores de señales de la superficie celular. El factor de necrosis

tumoral alfa (TNF- α), el ligando Fas (FasL o Apo-1) y el ligando inductor de apoptosis del factor de necrosis tumoral relacionado con TNF (TRAIL), éstos están ubicados en la superficie celular con dominios citoplasmáticos y su enlace se traduce constantemente en señales de muerte para las células [28]. Tanto el receptor de TNF- α y las vías de Fas son componentes importantes de la normalidad de las funciones inmunitarias, razón por lo cual, a pesar de que su activación es exitosa para la eliminación de células cancerosas, los efectos secundarios tóxicos en las células normales limitan el desarrollo de este tipo de terapias [29-30]. De hecho, el TNF- α soluble y Fas se han administrado por vía sistémica causando toxicidad severa, y sólo TNF- α ha sido aprobado para el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos, en combinación o de forma individual [31].

La vía apoptótica de TRAIL puede ser estimulada por los anticuerpos específicos agonistas del receptor de muerte (DR) como son: HGS-ETR1, HGS- ETR2 y HGS TR2J. Estos anticuerpos monoclonales anti-DR4 y anti-DR5, ya sea utilizados solos o en combinación con quimioterapia o irradiación inducen apoptosis en células tumorales *in vitro* e *in vivo* [31].

La proteína recombinante humana de TRAIL (rhTRAIL) sobresale en el campo de la terapia contra el cáncer debido a su acción específica en la inducción de la apoptosis en las células tumorales. La administración de rhTRAIL en animales portadores de tumores ha demostrado que induce significativamente la regresión tumoral, sin toxicidad sistémica [30]. Además, en combinación rhTRAIL con quimioterapia o radioterapia mejora considerablemente la eficacia antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además la combinación de rhTRAIL con anticuerpos

monoclonales, está siendo probada en células con bajos niveles de caspasas [32].

La vía intrínseca o vía mitocondrial se activa por daño al ADN, isquemia y estrés oxidativo, posteriormente existen cambios de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y se inicia la muerte celular [33]. En esta vía, p53 es importante debido a su papel de guardián del DNA. El gen TP53 es inactivado por mutación puntual en más del 50% de los tumores humanos. La pérdida de la función de tipo silvestre p53 permite la evasión de la apoptosis y la posterior selección de las variantes más malignas durante la progresión tumoral [34]. Varias estrategias se han diseñado y probado durante los últimos años para la reactivación de la vía p53. La reconstitución de TP53 tipo silvestre se puede lograr mediante terapia génica con la introducción de una copia intacta del gen TP53 utilizando un vector viral adecuado, generalmente el adenovirus, conocido como Adp53 [35]. El uso de Adp53 en la clínica, ha demostrado la estabilización en el crecimiento del tumor o incluso en la regresión del tumor, especialmente en pacientes con cáncer de pulmón y de cabeza y cuello [36][37]. La terapia génica con Adp53 ha sido hasta ahora limitada a la administración local, debido a la posibilidad de que sea neutralizada por los anticuerpos contra los antígenos virales [35] [31]; pero los resultados son alentadores al utilizarla de manera conjunta con otros antineoplásicos. Otra estrategia terapéutica se basa en controlar la degradación de p53, la cual está controlada por un único oncogen regulador maestro, MDM2, que modula negativamente la actividad y la estabilidad de p53 [38]. Las primeras moléculas descubiertas con capacidad antagonista de Mdm2 fueron las chalconas, pero éstas no son específicas [39]. Con la ayuda de

un diseño bioinformático, Zhao y colaboradores (2005) sintetizaron varios policíclicos no peptídicos antagonistas de MDM2; su evaluación inicial ha mostrado una moderada afinidad por MDM2 y la inducción de la vía intrínseca en líneas celulares tumorales. La clorofusina fue identificada mediante el uso de bibliotecas de extractos microbianos, y también tiene el mismo blanco terapéutico [40]. Otras moléculas capaces de interferir en la interacción de p53 y Mdm2 son las nutlinas, moléculas de tipo imidazol, que se unen al gen p53 en tres de los aminoácidos con residuos ácidos que interactúan con Mdm2 [41]. La activación de la vía de la p53 en las células cancerosas debido a la nutlinas, produce detención del ciclo celular en las fases G1 y G2, así como apoptosis vía caspasa dependiente, además otra de las ventajas de las nutlinas es el hecho de mostrar selectividad notable por la interacción p53-MDM2. Otro compuesto que activa p53 de tipo silvestre en las células tumorales humanas evitando la degradación por MDM2, identificado por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, por sus siglas en inglés) es RITA, que se une a la cadena N-terminal de p53 provocando un cambio conformacional que impide que se vincule a MDM2, resultando en la acumulación de p53 y la regulación positiva de genes diana de p53 [35].

Por otro lado, se conoce que las células tumorales son capaces de evadir la muerte, debido a la sobre expresión de genes antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL1) [42]; incluso la expresión aberrante de estas proteínas se correlaciona con resultados deficientes después de los protocolos tradicionales de quimioterapia [43]. En los últimos años se han realizado diversos cribajes con la finalidad de encontrar moléculas pequeñas que puedan utilizarse

como herramienta contra el cáncer y que bloqueen proteínas de tipo BCL-2, BCL-XL [35]. Utilizando diversas bibliotecas de productos naturales identificaron a la progidiosina (una biperrolidina). La optimización de éste producto dio como resultado el GX15-070 (Obatoclax®), que se une tanto a BCL-2, BCL-XL como a BCL-W; actualmente está en ensayos preclínicos, ya sea como único agente o en un régimen de combinación [44]. Otro producto natural con el mismo efecto, obtenido de la planta de algodón (*Gosypum hirsutum*), es el gossipol, el cual se une a BCL-2, BCL-XL y MCL1 [45], actualmente se encuentra en fase clínica II con el nombre de AT-101 [46]. De estudios de la relación estructura-actividad (SAR) en conjunto con la resonancia magnética nuclear (RMN), fue identificado ABT-737, el cual presenta una alta eficiencia de unión para el surco hidrofóbico de BCL-XL, fue identificado ABT-737 [47]. ABT-737 actúa sin bloquear la actividad de MCL-1, Bfl-1/A1 y Bcl-B. Esta función la cumple por desplazamiento de las proteínas BH3, como Bim y de la activación de proteínas de tipo pro-apoptótico (Bax y Bak), induciendo apoptosis en células de: leucemias y linfomas, de mieloma múltiple, de glioblastoma y de tumor de pulmón de células pequeñas [46].

La mayoría de las caspasas juegan un papel clave en la muerte celular programada, algunas de ellas en calidad de iniciadoras (caspasa-8, -9 y -10) y otras como ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) [33], sin embargo también existen proteínas que se unen a las caspasas e inhiben su función, y por lo tanto, permiten la evasión de la apoptosis. Estas proteínas son conocidas como inhibidoras de apoptosis (IAP) y proteínas ligadas al X inhibidoras de apoptosis (XIAP) [48]; la unión a las caspasas se da a través de los dominios BIR. En el caso de las XIAPs

se enlazan al dominio BIR3 de la caspasa 9; al mismo dominio BIR3 se une SMAC, una de las proteínas liberadas por la mitocondria en el proceso de apoptosis. La inhibición de las IAPs y XIAPs ha sido planteada como un mecanismo para tratar el cáncer, para lo cual se han desarrollado péptidos estructuralmente similares a SMAC; capaces de reactivar la apoptosis. Aunque estas moléculas por sí solas no han sido del todo exitosas, sin embargo en conjunto con otros fármacos incrementan la capacidad de producir apoptosis [49]. Otra de las proteínas inhibidoras de la apoptosis es la survivina, la misma que también promueve la proliferación y la invasión [50]; una de las características de la survivina es que está ausente en la mayoría de los tejidos adultos pero se localiza selectivamente en muchos tumores humanos, donde su sobreexpresión se correlaciona con un mal pronóstico y resistencia al tratamiento [51]. La survivina es un objetivo difícil para el desarrollo de fármacos clásicos, sin embargo podemos citar algunas estrategias inhibidoras de la expresión que están en fase preclínica [52]. El LY2181308 es un oligonucleótido antisentido (ASO) que se une al ARNm de la survivina, resultando en la degradación del ARNm, o en la inhibición de la traducción. Los estudios preclínicos demostraron que LY2181308 disminuyó tanto el ARN mensajero como la concentración de survivina en múltiples líneas de células tumorales y en xenotransplantes, en los cuales existe una detención del ciclo celular, un aumento de apoptosis e inhibición del crecimiento tumoral. Los estudios preclínicos también han demostrado que LY2181308 sensibiliza a las células a las terapias citotóxicas [53]. El SPC3042, también conocido como EZN-3042, es un oligonucleótido cerrado (LNA) dirigido a la survivina [54]. Los LNA permiten aumentar la estabilidad y la potencia de la

inhibición en comparación con ASO. Se ha visto que en células de cáncer de próstata existe una disminución de la survivina al ser expuestas a SPC3042/EZN-3042 produciéndose una detención en el ciclo celular, inducción de apoptosis, y disminución de BCL-2; este oligonucleótido se encuentra actualmente en fase de evaluación en casos de leucemia linfoblástica aguda, solo y en combinación con la quimioterapia tradicional. El YM155 es una pequeña molécula de tipo imidazol identificada como un inhibidor selectivo de la expresión de survivina, el mecanismo de inhibición parece ser independiente del ciclo celular y es específico para una región central 269-pb del promotor; en estudios preclínicos, la inhibición de survivina por YM155 ha demostrado ser efectivo en la inhibición de células de cáncer de Merckel [55].

Los avances conceptuales más notables desde entonces han involucrado a otras formas de muerte celular que amplían el alcance de la 'muerte celular programada' como una barrera para el cáncer [4]. La autofagia representa una respuesta fisiológica celular importante igual que la apoptosis. La autofagia es una vía de degradación lisosomal que degrada orgánulos celulares y proteínas con el fin de mantener la biosíntesis celular y viabilidad durante el estrés metabólico, producido por ejemplo en la privación de nutrientes [56, 57]. Sin embargo, debido a la compleja naturaleza de dos caras de la autofagia, el de favorecer o prevenir la muerte es necesario establecer claramente el papel de la autofagia en la supervivencia del tumor vs muerte puede ayudar a determinar su potencial terapéutico para el cáncer. La inhibición de la autofagia puede mejorar la eficacia de los fármacos anticancerígenos utilizados en la actualidad en la activación de la quimioterapia y de la radioterapia de vías de señalización autofágicas. Por el

contrario, la promoción de la autofagia puede inducir la muerte de células de cáncer con altos umbrales a la apoptosis [58-60]. Por ejemplo, el tratamiento con un inhibidor de la autofagia (cloroquina) se consigue una mayor regresión del tumor en respuesta a agentes alquilantes en un modelo de ratón de linfoma, la hidroxicloroquina se emplea para sensibilizar células cancerosas humanas a la terapia del cáncer [61, 62].

1.1.4 Potencial ilimitado de replicación

En principio, las células normales llevan intrínsecamente un programa autónomo que limita su capacidad de proliferación y multiplicación (este programa puede operar independientemente de las vías de señalización célula a célula). Hayflick (año), demostró *in vitro* que una vez que las poblaciones celulares han pasado por un cierto número de divisiones, ellas no vuelven a dividirse, proceso al cual denominó senescencia [56]. Greider y Blackburn en 1985, descubrieron la telomerasa, enzima que sintetiza el DNA de los telómeros, lo que confiere estabilidad a la molécula de DNA; en ausencia de esta enzima, gradualmente los telómeros se van acortando impidiendo la replicación del DNA, así como el procesamiento de la parte terminal de los cromosomas, produciéndose como consecuencia detención del ciclo celular o muerte celular [57]. El mantenimiento de los telómeros y la inmortalidad replicativa al parecer son cruciales para la progresión del tumor, además la telomerasa es codificada por genes únicos (no redundantes), lo que podría significar que es menos probable que los tumores desarrollen resistencia a terapias dirigidas en contra de la telomerasa. Así

mismo, la baja o transitoria expresión de la telomerasa en tejidos normales, incluyendo las células madres normales, así como el hecho de que los telómeros generalmente son más largos en células normales que en células del tumor, proporcionaría cierta especificidad de los fármacos cuya diana es la telomerasa, y reduciría la probabilidad de toxicidad al tejido normal. Estos factores sugieren que los medicamentos para el cáncer dirigidos a la telomerasa representan una ventana terapéutica amplia [58].

En las siguientes secciones se describen diversos compuestos que se han desarrollado con base a estos fundamentos, aunque la mayoría están en fase clínica.

El componente de RNA, hTR, necesario para la transcripción reversa de la telomerasa, ha sido considerado como un buen blanco para inhibidores de los oligonucleótidos de tipo “antagonistas de la cadena”; las moléculas más promisorias son el GRN13 y su derivado GRN163L [59]. El GRN163L, tiene alta afinidad con la región de una sola hebra de la plantilla de telomerasa y a su vez bloquea el acceso del telómero a la telomerasa; esto conlleva a la inhibición de telomerasa, el acortamiento del telómero y en última instancia la detención del ciclo celular y/o la muerte. Los estudios de la eficacia con GRN163L han sido conducidos en el modelo de xenotransplante de ratón con varios tumores humanos: pulmón, mama, próstata, riñón, cerebro, y cánceres hematológicos incluyendo mieloma múltiple y linfoma [60]. Además, el GRN163 presenta adecuadas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como el hecho de que es suficientemente potente, eficaz y seguro. Al utilizar GRN163L

conjuntamente con otros medicamentos o con irradiación existe un efecto sinérgico [61].

La telomerasa y los péptidos del complejo TERT, "*per se*" actúan como epítomos, capaces de estimular al complejo de histocompatibilidad, produciendo respuestas de los linfocitos T citotóxicos, proporcionando inmunidad protectora contra los tumores [62]. GV1001 y GRNVAC1, fueron diseñados para estimular la respuesta de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ [63], GV1001 es un péptido de 16 aminoácidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II restringido a hTERT. El GV1001 se procesa para producir endógenamente un MHC de clase I para producir tanto la respuesta de CD4⁺ y CD8⁺. GRNVAC1 en cambio es una preparación de células dendríticas autólogas maduras transducidas por el mRNA derivado de la proteína TERT-lisosomal asociada a membrana (LAMP) fusionada con cDNA construido. El segmento integral cercano de TERT codificado por GRNVAC1 es procesado por las células dendríticas autólogas con lo que se asegura que la respuesta inmunológica sea policlonal, no obstante es esencialmente específico para cualquier epítomo de TERT expresado por el tumor del paciente [62]. GV1001 está actualmente en las fases II y III para tratamientos en cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer pancreático respectivamente y GRNVAC1 está en fase II en el caso de leucemia mieloide aguda [64].

Los agentes anti-telomerasa deben llevar al acortamiento de los telómeros progresivamente, disminuyendo la proliferación una vez que los telómeros han alcanzado una longitud críticamente corta [65]. Este paradigma ha sido verificado por varios experimentos, los cuales fueron diseñados con el propósito de la

validación de un nuevo blanco terapéutico: los telómeros. Cada vez es más claro que el DNA puede adoptar una gran variedad de conformaciones alternativas basadas en la secuencia de motivos particulares y la interacción con varias proteínas, que incluyen estructuras G cuádruples (G4) (y que al parecer se presentan solo bajo condiciones fisiológicamente relevantes) tienen funciones *in vivo* y estarían constituyendo los telómeros [66]. Los estabilizadores de ligandos G4 actúan indirectamente sobre la telomerasa, provocando la inhibición de su actividad catalítica. Los ligandos G4 estabilizan o promueven los motivos G4, ya que previenen el desarrollo y que se abran los extremos telo-alfanuméricos de la telomerasa. BRACO-19, RHPS4 y telomestatina son tres de los ligandos de unión a G4 más estudiados. La telomestatina es una de las moléculas pequeñas más potentes de los motivos G4 con alta selectividad para las células tumorales y con efectos mínimos sobre las células normales. La telomestatina es un producto natural con una estructura compleja compuesta de una gran variedad de anillos poli-oxazol que forman enlaces macrocíclicos, promoviendo la formación y estabilización de la estructura G4 mediante la unión a las guanosinas en ambos extremos del G4 [67]. Además también puede causar un acortamiento de los telómeros antes de lo esperado en tumores diferentes, y probablemente la inhibición de la telomerasa puede estar contribuyendo a este efecto [68]. Mediante este mecanismo la telomestatina inhibe la proliferación de células tumorales con bajos valores de CI_{50} , en varias líneas celulares tumorales: de mama, de páncreas, cáncer de células cervical de mieloma, neuroblastoma, leucemia mieloide [69].

BRACO-19 y RHPS4 son prometedoras moléculas estabilizadoras de ligandos G4,

similares en estructura a la telomestatina pero con menor selectividad tumoral. Los estudios han demostrado que BRACO19 puede ser una terapia exitosa como agente único para los tumores con telómeros más cortos [70] y RHPS4 funciona mejor cuando se usa en combinación con otras terapias [71].

Los nanotubos de pared única (SWNT de carbono) se han reportado como el primer ligando que puede estabilizar selectivamente al i-motivo del DNA telomérico humano de ADN, siendo un prototipo de moléculas que podrían servir como inhibidores de telomerasa [72].

1.1.5 Activación de la invasión y metástasis

La metástasis es un proceso complejo mediante el cual las células malignas del tumor canceroso cruzan fuera del órgano principal, invaden membranas de las estructuras del tejido conectivo, viajan a un sitio distante a través de la circulación linfática o hematológica y, finalmente, se establecen en una posición clínicamente detectable en un órgano lejano [73].

Aunque todavía no existen fármacos aprobados por la FDA creados con el fin de inhibir el proceso de metástasis, algunos se encuentran en fase clínica, basados en las mismas estrategias que se han desarrollado los demás fármacos, usando como diana los genes involucrados en la metástasis. A pesar de ser un proceso extremadamente complejo, y aun sin entender totalmente los cambios bioquímicos y genéticos que lo controlan, al menos 23 genes supresores de la metástasis han sido identificados. En 1998, se descubrió a NME1 (non-metastatic cell 1), conocido también como NM23, fue el primer gen supresor de metástasis

identificado; la expresión de NM23 experimentalmente puede derogar la metástasis espontánea y sin afectar el crecimiento de células tumorales *in vitro* o *in vivo* [74]. Resultados preclínicos muestran que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) parece incrementar a NM23-H1, lo que reduce la colonización metastásica [75]. Otros genes importantes en la terapia son KAI 1 y KMI [76]. El gen KAI1 es un gen supresor de metástasis endógeno, las funciones supresoras clave descritas para su proteína son la regulación decreciente del factor de crecimiento epidérmico de señalización y la endocitosis. Para la re-expresión de KAI1 endógeno en el cáncer de próstata se usó genisteína una isoflavona aislada de la soya, la cual produce la reversión de la pérdida de KAI1 en las células de cáncer de próstata en el modelo de ratón [77]. Las técnicas tradicionales de terapia génica han sido también utilizadas en xenotransplantes de células cancerosas de tipo pancreático establecidas como tumores subcutáneos en ratones desnudos; reduciendo sustancialmente metástasis espontánea pulmonar [78].

Los pacientes con cáncer avanzado de mama y de próstata casi siempre desarrollan metástasis óseas. Las metástasis óseas por lo general están asociadas con un fuerte dolor de huesos, debido a lesiones generalmente de tipo osteolítico u osteoblástico. Los bifosfonatos (análogos al pirofosfato), tienen alta afinidad para unirse a las superficies de mineralización ósea e inhiben la resorción ósea osteoclástica así como pueden disminuir la carga tumoral ósea [79]. Además la invasión tumoral requiere la adhesión de las células cancerosas a la matriz extracelular (ECM), la proteólisis pericelular de la ECM y la posterior migración de células de cáncer, y al parecer los bisfosfonatos también inhiben la adhesión de

células de cáncer de mama y de próstata a la ECM *in vitro*, lo que impide la propagación de las células cancerosas al hueso. El zoledronato ha demostrado reducir la adhesión de células de cáncer de próstata a la matriz ósea mineralizada; el tratamiento de células estromales de médula ósea con zoledronato resultó en una reducción significativa de la expresión de varias moléculas de adhesión celular [80, 81].

Como ya se mencionó anteriormente, otra de las vías de proliferación es la vía de ERBB. El receptor del factor de crecimiento epidermal humano ERBB2 (también conocido como HER2/neu) presenta actividad sobre las lesiones osteoblásticas. El ERBB2 es miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (Familia erbB), estas proteínas son potentes mediadores del crecimiento celular normal y el desarrollo [82, 83]. Este receptor ha demostrado ser un potente objetivo de la terapia contra el cáncer, incluyendo las terapias basadas en anticuerpos para prevenir la unión con su ligando y la formación del dímero. Dentro de los fármacos más exitosos en el caso de cáncer de mama que presentan una amplificación del ErbB2 (también conocido como HER2) están el trastuzumab [84] y el erlotinib; el gefitinib se utiliza en cáncer de pulmón que expresa mutante del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR)[85].

1.1.6 Incremento de Angiogénesis

Los vasos sanguíneos proporcionan el oxígeno y los nutrientes que son cruciales para el funcionamiento y supervivencia celular (luego de la formación de los tejidos

existe una adecuada regulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos). En el desarrollo del tumor, el proceso de angiogénesis es anormal, caracterizándose por un incremento en el número de células endoteliales en proliferación y la alteración morfológica de los vasos sanguíneos [86]. La transición de un microambiente tumoral a un estado pro-angiogénico, es parte de la evolución del tumor caracterizado por desregulación de algunos factores y sus receptores. El desarrollo de fármacos que interrumpen el proceso de angiogénesis, ha avanzado rápidamente en los últimos 30 años, la gran mayoría de ellos están enfocados a la inhibición tanto de los factores proangiogénicos solubles (VEGF, EGF, PDGF, interleucinas) como a sus receptores debido a que las células tumorales son capaces de segregarlos [87,88]. El primer anticuerpo anti-VEGF-A, fue el bevacizumab (Avastin; Genentech), utilizado en los tratamientos de cáncer de colon rectal [89]. Otros anticuerpos inhibidores de diversos tipos de VEGF son: HUMV833, IMCL-1121B y IMCB-18F1, pero aún se encuentran siendo evaluados en fase clínica [90]. Pequeñas moléculas inhibidoras de las tirosinas cinasas, bloqueadoras de la señalización de los factores pro-angiogénicos, se han desarrollado, tales como el sorafenib, sunitinib, imatinib, considerados como los fármacos más exitosos en ciertos tipos de cáncer [91].

El flujo y tensión sanguínea influyen en el desarrollo vascular y el remodelamiento a través de la creación de un complejo mecánico y sensorial. La fibronectina es una glicoproteína de gran tamaño que está presente en grandes cantidades en el plasma y los tejidos, mediante un mecanismo de splicing alternativo, a nivel de la transcripción primaria se produce EDB, constituido por 91 aminoácidos, que se

inserta en la molécula de fibronectina [92]. Sin embargo en muchos tumores sólidos agresivos, la proteína EDB es abundante mientras que es casi indetectable en adultos sanos. La EDB presenta alta afinidad sobre el anticuerpo humano L19, que se ha demostrado eficaz para localizar el tumor en los vasos sanguíneos en modelos animales y en pacientes con cáncer después de la inyección intravenosa [93]. Un gran número de derivados terapéuticos de tipo L19 se han producido y probado en animales, incluidos conjugados a fluorocromos y fotosensibilizadores, liposomas, agentes procoagulantes, citoquinas, enzimas y otras proteínas [94].

Durante la angiogénesis, las integrinas son esenciales para la migración, la proliferación y la supervivencia de las células endoteliales. Muchas integrinas están implicadas, directa o indirectamente, en la función de regulación de la célula endotelial. Las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ parecen estar asociadas con la angiogénesis del tumor debido a la interacción de $\alpha V\beta 3$ con la matriz y a que $\alpha V\beta 5$ tiene un importante papel en el mantenimiento de la vasculatura del tumor [95]. Se han utilizado nanopartículas de tipo catiónico acopladas a una integrina-ligando $\alpha V\beta 3$, que permiten una entrega selectiva en los genes angiogénicos de los vasos sanguíneos, como un beneficio terapéutico importante en ratones portadores de tumores [93]. Las integrinas, también han sido seleccionadas como blancos terapéuticos directos, el anticuerpo mAb etaracizumab ('Vitaxin') está en desarrollo clínico como una terapia anti-angiogénica, dirigido específicamente a las integrinas.

La terapia vascular revisada previamente está dirigida a prevenir la formación de nuevos vasos en el proceso tumorigénico, pero además se han desarrollado

agentes capaces de lesionar la vascularización; causando una rápida y selectiva disminución de la estabilidad de los vasos del tumor, produciendo la muerte en las células secundarias. Moléculas estructuralmente relacionadas a la colcemida, agente quimioterapéutico clásico que se enlazan a tubulina, han sido desarrolladas con la finalidad de inestabilizar los vasos de tumor como son el caso de las combrestatinas aisladas del sauce africano *Combretum caffr* [96]. El fosfato de sodio de la combrestatina A-1, es el más potente inhibidor de tumores desarrollado por VDA (OXIGene OXI4503). Otras moléculas sintéticas análogas a las combrestatinas han sido desarrolladas, como es el caso de AVE8062 (Aventis Prhama), que a diferencia de la colchicina y otros agentes que se unen a los microtúbulos presenta una ventana terapéutica mucho más amplia en modelos animales, el DMXAA y la FAA son dos tipos de moléculas que tienen una serie de acciones anti-vasculares, incluyendo la inducción de citoquinas [87].

Al comparar diversos tejidos normales con tumorales se ha demostrado que existen dos características importantes del transcriptoma endotelial: (1) las células endoteliales de diversos tejidos tienen características moleculares únicas, y (2) las células endoteliales experimentan diversas formas de angiogénesis debido a que expresan variados sistemas de genes, dando cabida a nuevas terapias contra moléculas expresadas solamente en el contexto de la angiogénesis del tumor para evitar interrumpir la angiogénesis fisiológica que ocurre durante el ciclo reproductor femenino o en la cura de una herida [97]. La proteína Robo4, es un miembro específico de las células endoteliales, participa en la guianza axional de los vasos sanguíneos; los niveles de esta proteína son altos en células endoteliales de los vasos del tumor pero no en los vasos del tejido normal [98]. El

dominio extracelular de Robo4 es capaz de bloquear la angiogenesis en modelos *in vivo* como *in vitro* [99].

En la figura 2 se muestran algunos de los enfoques terapéuticos para el tratamiento del cáncer de los que hemos hablado.

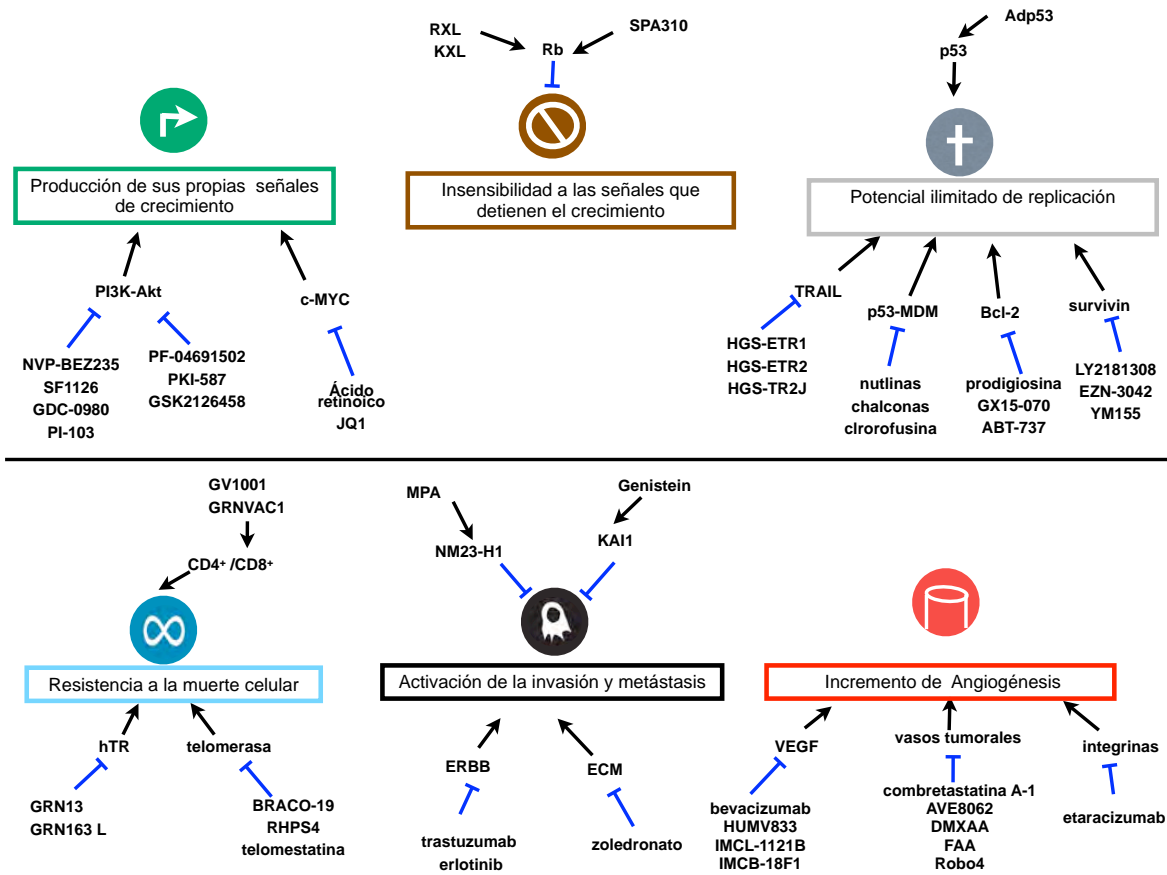


Figura 2. Enfoque terapéutico de los hitos de la célula tumoral (Parte 1).

1.1.7 Inestabilidad genómica y mutaciones

La adquisición de las características distintivas de las células tumorales dependen en gran parte de una sucesión de alteraciones en los genomas de las células neoplásicas, las cuales se logran por una selección subclonal debido a ciertos genotipos mutantes que les confieren una ventaja selectiva [100]. El grupo de

genes relacionados con el desarrollo de la inestabilidad génica son conocidos como genes “cuidadores” o de “mantenimiento” los cuales están relacionados principalmente con prevención, detección y reparación del DNA [101], uno de los más estudiados es PARP1, cuyas proteínas son las más abundantes en el núcleo, cuya función catalítica es de sensor de daños de ADN de una sola cadena y ayudar en su reparación [102]. Muchos agentes de la quimioterapia de uso común, tales como agentes alquilantes de ADN y camptotecinas causan daño produciendo roturas de cadena simple. Para mejorar este efecto, varios inhibidores de la PARP se desarrollaron [103-114]. Inhibidores de tipo catalítico como rucaparib (AG014699), olaparib (AZD-2281 / KU-0059436), veliparib (ABT-888) [115], LT-673, BMN-673 niraparib (MK-4827), CEP-9722, y E7016 (GPI-21016) [116-118]; y el inhibidor no competitivo de PARP, iniparib (BSI-201), se han estudiado ampliamente en el tratamiento clínico, administrados tanto solos como en combinación para actuar como agentes de quimioterapia y radiosensibilizantes, inicialmente utilizados en combinación con temozolomida. La toxicidad de los inhibidores de PARP, especialmente de la mielosupresión, sigue siendo una preocupación importante al avanzar en los ensayos de fase III, en particular a dosis continuas en lugar de intermitentes. Como todavía no está investigada, las consecuencias de la inhibición de PARP [110,119] se verán a largo plazo.

La letalidad sintética, es el término utilizado para cuando la perturbación simultánea de dos genes al mismo tiempo da como resultado una combinación mortal. La prueba de principio del concepto de letalidad sintética es clínicamente traducible en la eficacia de los fármacos que se dirigen a PARP, en los tumores

con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 [120-122]. Los inhibidores de PARP también pueden utilizarse en tumores mutantes BRCA1/2 que son sensibles a la monoterapia con rucaparib [123]. Aunque la estructura química de E-7449 no ha sido revelada, los datos pre-clínicos muestran la capacidad del compuesto para potenciar los efectos citotóxicos de la radioterapia y la quimioterapia. Se ha informado también que el compuesto inhibe el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplantes-BRCA deficiente, sin toxicidad tras la administración oral una vez al día como agente único. Otros inhibidores de PARP, como PF-01367338 y BSI-201, se están evaluando en ensayos de fase II en pacientes con BRCA-asociados con cáncer de ovario avanzado [124, 125]. En vista de la necesidad de mejorar los resultados terapéuticos para pacientes con tumores HR-deficientes como el cáncer de ovario seroso de alto grado, así como la actividad de los inhibidores de PARP, más esfuerzos preclínicos y clínicos para entender esta nueva clase de agentes son necesarios y justificados [121-125].

Otro de los blancos terapéuticos dentro del grupo de los “genes cuidadores” es ATM, el cual responde específicamente a roturas de doble cadena del ADN, siendo importante en los puntos de control G1/S, y Chk2 [103]; ATM también está implicado en la activación de Akt, lo que ha permitido establecer a ATM como una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer [104]. Como se había mencionado en párrafos anteriores, la activación de la vía PI3K/Akt, promueve la progresión del cáncer mediante el fomento de la proliferación celular y la supervivencia celular. Dentro de los inhibidores ATM está KU55933, el cual previene la fosforilación de ATM, con lo cual bloquea también la fosforilación de Akt e inhibe la proliferación de células de líneas celulares de cáncer [105]. Otro de los aspectos

relevantes de KU55933 es el hecho de ser un inhibidor específico de ATM teniendo una selectividad de al menos 100 veces mayor que otras cinasas relacionadas, incluyendo PI3K [106]; además en terapia combinada con agentes capaces de producir roturas de doble cadena como la radiación, temolomida, entre otros, están siendo probados con resultados alentadores [107, 108], basados en el hecho de que la inhibición de ATM cinasa es crítica para la reparación del DNA y sensibilizaría a las células y aumentaría el efecto farmacológico [109].

Por otro lado, la familia Aurora cinasa está vinculada también en el proceso de la tumorigénesis, principalmente en el proceso de inestabilidad cromosómica [110], así por ejemplo: cuando existe una sobreexpresión de la Aurora A, se producen células aneuploides que contienen múltiples centrosomas y múltiples ejes, provocando la transformación celular de fibroblastos, tanto *in vivo* como *in vitro* [111, 112], así mismo cuando existe una sobreexpresión de la Aurora cinasa B, se interrumpen los microtúbulos del cinetocoro, la formación de surcos y la citocinesis, dando lugar a poliploidías [112]. Las Aurora cinasas han atraído mucho la atención sobre todo en los últimos años, tanto en el mundo académico y la industria farmacéutica, y una gran variedad de ATP-inhibidores competitivos se encuentran actualmente en desarrollo clínico, estos incluyen VX-680, PHA-739358, R763, MLN8054, MLN8237, PF-03814735, AZD1152, GSK1070916, hesperadina; entre otros [21, 113-116]. Curiosamente en estudios preclínicos *in vivo*, los inhibidores de aurora cinasas suprimen el crecimiento tumoral, independientemente de sus perfiles de especificidad, destacando el potencial terapéutico de Aurora A y B como dianas para fármacos candidatos contra el

cáncer; sin embargo también han presentado toxicidad principalmente de tipo mielosupresión y neutropenia.

1.1.8 Desregulación energética celular

Con la percepción alterada del microambiente tumoral, las células de cáncer experimentan cambios profundos en su metabolismo intrínseco. La tendencia de las células cancerosas es experimentar una reprogramación metabólica, caracterizada por una mayor actividad en la glicólisis aeróbica y por la desregulación del metabolismo lipídico, conocido también como “efecto Warburg”, descrito hace ya varios años [117]. En muchas células cancerosas, la reprogramación bioenergética implica cambiar la producción de ATP por la fosforilación oxidativa en células quiescentes y diferenciadas, en respuesta a la exigencia de equilibrar las necesidades energéticas con la generación de sustrato para la biogénesis y la reproducción celular en células de rápido crecimiento [118]. El estado hiperglicolítico específico de las células cancerosas, podría conducir al desarrollo de terapias antitumorales selectivas; así por ejemplo la inhibición de la glicólisis mediada por 2-desoxi-D-glucosa (2DG) aumentó significativamente la citotoxicidad del cisplatino en cáncer de cabeza y cuello y están en curso estudios en fase I/II de ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados de cáncer de próstata [119]. Sin embargo, existe la preocupación de que la 2DG pueda comprometer el metabolismo glicolítico del cerebro y del corazón, hay que ver si queda una amplia ventana terapéutica como para justificar su desarrollo clínico. La hexocinasa (HK) una de las principales isoenzimas que fosforila la

glucosa para iniciar la glicolisis, frecuentemente se sobre-expresa en tumores humanos y se da una unión más fuerte entre la hexocinasa a los canales de aniones dependientes de voltaje (vDAC) de la mitocondria en células cancerosas que en normales [120]. Las estrategias destinadas a perturbar la interacción entre la HK y vDAC en la membrana externa, han demostrado matar preferentemente a las células tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante la promoción de apertura del poro mitocondrial. Entre moléculas con esta actividad podemos mencionar al 3 bromopiruvato; estudios previos han demostrado que es sumamente eficaz en modelos animales de tumores implantados fenotipo "Warburg" para lograr la muerte de células tumorales [121].

Otro de los compuestos inhibidores de la HK es el metil jasmonato, una fitohormona, que altera la interacción entre la HK y la vDAC, causando la inhibición de la inducción de la glucólisis y la MOMP [122]; el metil jasmonato, tiene actividad anticancerígena selectiva en estudios clínicos [123].

La metabolización de la glucosa en gran parte depende de la enzima piruvato cinasa; la mayoría de los tejidos adultos expresan piruvato cinasa M1 (PKM1, por sus siglas en inglés), mientras que la piruvato cinasa M2 (PKM2) se expresa durante el desarrollo embrionario; sin embargo las células tumorales, expresan exclusivamente PKM2. A pesar de la similitud entre PKM2 y otras isoformas, ha sido posible la inhibición selectiva [124]; mediante iRNA se puede bloquear selectivamente y producir muerte celular [125], o por moléculas como la shikonina y la alkanina que son hidroxinaftoquinonas de origen natural [126] así también el resveratrol, de origen natural es capaz de inhibir al PKM2 *in vitro* en células MCF-7 [127].

La lactato deshidrogenasa A (LDHA) además de ser importante en el metabolismo celular es un gen diana de Myc [128], y fundamental para la tumorigénesis; debido a que LDHA es esencial para la producción de lactato en el efecto Warburg; su inhibición se dirige al corazón de la glicolisis aerobia [129]. El FX11 ácido [3-dihidroxi-6-metil-7-(fenilmetil)-4-propilnaptaleno-1-carboxílico], inhibe la LDHA, desencadenando estrés oxidativo en células de cáncer resultando en muerte celular necrótica, FX11 es capaz de inducir la regresión del linfoma [130]. Por lo expuesto anteriormente, en los últimos años se ha demostrado que es factible desarrollar fármacos focalizados en el metabolismo del cáncer y por lo tanto, se abre el camino para la búsqueda de clases únicas de fármacos contra el cáncer [117].

1.1.9 Evasión del reconocimiento del sistema inmune

Aunque las células tumorales deberían potenciar la respuesta inmune y ser eliminadas, en algunos de los casos esto no sucede, evitando las células tumorales el rechazo celular [131]. A menudo las células tumorales presentan estrategias que promueven la evasión de reconocimiento inmune, tales como exclusión física de las células inmunes de los sitios tumorales, pobre inmunogenicidad debido a la reducción de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la alteración del reconocimiento celular por parte de las células asesinas (NK, por sus siglas en inglés). Además, algunos tumores previenen el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria mediante la secreción de un gran número de factores inmuno-moduladores que interfieren con:

(1) la activación de las células dendríticas y de las células T, y (2) el bloqueo de la producción de citoquinas pro-inflamatorias [132]. A pesar de estos obstáculos, modernas terapias basadas en el sistema inmune continúan mostrando un mayor potencial para el tratamiento de enfermedades malignas e incluso la terapia inmunológica ya se ha establecido como un componente central de muchos tratamientos del cáncer [133]. Los tumores expresan una amplia variabilidad de proteínas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune, por lo que ciertas manipulaciones permiten activar la inmunidad antitumoral y se han empleado en algunas terapias, como son: (1) la administración de citoquinas, (2) la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales, (3) la introducción de los adyuvantes en el microambiente tumoral, entre otras.

En el estado fisiológico normal, la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es importante para crear un ambiente que limite el daño a tejidos debido a un sistema inmunológico hiperactivo; no obstante, mediante el fomento de la supresión inmune, la IDO puede facilitar la supervivencia y el crecimiento de células tumorales que expresen antígenos únicos que normalmente serían reconocidos como extranjeros [134]. En estudios preclínicos, los inhibidores de moléculas pequeñas de la IDO pueden revertir este mecanismo de inmunosupresión, como el caso de 1-metil triptófano (1MT). La cooperación entre 1MT y agentes quimioterapéuticos tradicionales en modelos animales crea una forma nueva y atractiva de imaginar tratamientos para los tumores humanos [135,136].

La administración de anticuerpos monoclonales ha demostrado ser una de las formas más exitosas de la terapia inmune para el cáncer. Ya hemos citado en los apartados anteriores algunos ejemplos aplicados a distintos blancos moleculares.

La administración sistémica de anticuerpos monoclonales puede generar una respuesta inmune inmediata a diferencia de la inmunidad endógena [63]. Debido a que los anticuerpos terapéuticos se producen inicialmente en animales, esto puede conducir a un tratamiento limitado a reacciones de hipersensibilidad, sin embargo, estas reacciones se han minimizado mediante la sustitución de secuencias de IgG1 humanos fuera del dominio de unión al anticuerpo. Aproximadamente una docena de anticuerpos monoclonales han sido aprobados para el tratamiento clínico del cáncer principalmente en enfermedades malignas y cáncer colon rectal. El rituximab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado y ampliamente utilizado solo y en combinación con otros antineoplásicos como ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP) como parte del tratamiento estándar para el LNH [137,138]. Numerosas estrategias basadas en anticuerpos terapéuticos han sido desarrolladas con el objetivo de dirigir las células del sistema inmune para mejorar respuestas inmunes antitumorales. El CD40 se expresa constitutivamente en las células presentadoras de antígenos, es miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, promueve la maduración funcional que conduce a un aumento en la presentación de antígeno y la producción de citoquinas y facilita la presentación cruzada de antígenos. Muchos tumores expresan el CD40, incluyendo los carcinomas de ovario, de nasofaringe, de vejiga [139]. Existe evidencia en la literatura de que los anticuerpos agonistas de CD40 podrían ejercer su actividad anti-tumoral por dos mecanismos distintos; uno directo, en el cual los anti-CD40 inducen la fagocitosis dependiente del anticuerpo de las células tumorales e inhibe la proliferación inducida por CD40-CD40L, y otro indirecto mediante la activación de la respuesta

inmune anti-tumor a través de la maduración de células presentadoras de antígenos [140]. Entre los anticuerpos agonistas de CD40 están CP-870,893, lucatatumumab, dacetuzumab, los cuales están siendo probados en fases clínicas [141,142].

La inmunización activa contra los antígenos tumorales ha demostrado ser mucho mayor a través de inhibidores de las células T mediante el uso de anticuerpos anti-CTLA-4 [143]. Para restablecer la respuesta inmune antitumor primero: se podría aplicar de manera sistemática a muchos tipos de tumores; y segundo: permitir al sistema inmune detectar y erradicar los tumores en una etapa relativamente temprana.

1.1.10 Inflamación promotora de tumores

Diferentes causas, mecanismos e intensidad de inflamación están relacionadas durante todo el proceso tumoral como en la carcinogénesis, durante el crecimiento tumoral, en la invasión y metástasis e incluso durante la terapia [144]. La respuesta inflamatoria precede al desarrollo del tumor cuando existe (1) infección por patógenos tumorigénicos (*Helicobacter pylori*, *Virus de la hepatitis* y *Schistosoma*) [145], (2) enfermedades crónicas (enfermedades autoinmunes, obesidad), (3) exposición a carcinogénicos ambientales (partículas del humo del tabaco, asbesto) [146]. Por otro lado, estudios epidemiológicos y experimentales han puesto de manifiesto que una gran variedad de fitoquímicos presentes en nuestra dieta diaria son potenciales agentes quimiopreventivos que pueden alterar o corregir las funciones celulares no deseadas causadas por la

transmisión de la señal anormal pro-inflamatoria. Entre los metabolitos secundarios que presentan esta actividad están la curcumina, el resveratrol, el ácido ursólico, la capsaicina, la silimarina, entre otros [147]. La grasa dietética puede contribuir al cáncer asociado a la inflamación a través de un metabolismo anormal del ácido araquidónico; sin embargo el consumo de ácidos grasos polinsaturados omega-3 podrían evitar la carcinogénesis; se conoce actualmente que a partir de estos ácidos, endógenamente se obtienen mediadores químicos como las resolvinas y protectinas que desempeñan un papel fundamental en la resolución de la inflamación e inmunomoduladores respectivamente [148]. Así mismo la combinación del ácido docosahexaenoico (DHA) junto con inhibidores de la COX-2, resulta en sinergismo para la eliminación de células del neuroblastoma [149]. También es conocido que el proceso inflamatorio está mediado por eicosanoides generados a partir del ácido araquidónico por distintos sistemas enzimáticos: ciclooxigenasas (COX 1 y 2), lipoxigenasas (5-LOX, 12-LOX, 15 Loxa-, 15-LOXb), y citocromos P450. Estas vías son el blanco de los fármacos aprobados para el tratamiento de dolor, asma, alergia, trastornos cardiovasculares, y también son evaluados como sustancias anti-cáncer [150]. La mayoría de las investigaciones radican en las vías de la COX y de la LOX; sin embargo también se ha planteado el producir antagonistas de los receptores y de la sobreexpresión de enzimas metabolizadoras de eicosanoides así como el uso de mediadores lipídicos endógenos anti-inflamatorios [149]. Varios fármacos antiinflamatorios no esteroideos inhibidores de COX-2, tienden a reducir la incidencia de tumores cuando se les utiliza como profilácticos; el caso más estudiado es la aspirina que previene efectivamente el cáncer de colon,

teniendo similares resultados el caso de cáncer mama y de próstata [151]. Como la aspirina, estos fármacos no son muy específicos y generalmente tienen efectos secundarios que impiden su administración a largo plazo, excepto en individuos de alto riesgo. La preselección adecuada de pacientes que podrían beneficiarse de estrategias preventivas debería mejorar la eficacia y la utilidad de la prevención del cáncer [150].

La mayoría (si no todos) de los tumores malignos sólidos desencadenan una respuesta inflamatoria intrínseca que acumula un microambiente pro-tumorigénico. Además de la proliferación de células autónomas, ciertos oncogenes, tales como miembros de la familia de RAS y MYC, inducen a un programa transcripcional que conduce a la remodelación del microambiente del tumor a través del reclutamiento de leucocitos, la expresión del promotor de tumores quimiocinas y citoquinas, y la inducción de un cambio angiogénico [152]. In vitro, estos efectos han sido confirmados con estrategias de anticuerpos neutralizantes frente a distintas quimiocinas (anti-CXCL12/CXCR, anti-CXCL, anti-CXCL2/CXCR2 anti-CCL2/CCR2, anti-CXCL13/CXCR5, anti CCL5-/CCR5 y anti-CCL11/CCR2) logrando bloquear los efectos antiapoptóticos y proliferativos en líneas celulares tumorales obtenidos a partir de cánceres de pulmón, melanoma, ovario, mama o leucemia [153]. Así mismo, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son quimiocinas, que desempeñan un papel clave en las respuestas inmunes e inflamatorias mediante la promoción de reclutamiento y activación de las diferentes subpoblaciones de leucocitos. Estas quimiocinas se unen al receptor de membrana CXCR3. Se han simulado sitios de unión y fosforilación entre ellos; que podrían servir como blancos terapéuticos en el futuro [154]. Se conoce que antagonistas TNF- α

pueden inhibir la producción de citoquinas y quimioquinas, involucradas en el reclutamiento de células inflamatorias, angiogénesis y degradación de la matriz extra-celular [155]. Tanto *in vitro*, en líneas celulares, como *in vivo*, en modelos de ratones, se ha demostrado que TNF- α está implicado en el crecimiento de tumores y esto abrió la posibilidad de que el neutralizarlo podría ser beneficioso para los pacientes de cáncer [156]. En el tratamiento contra el cáncer y en términos de promoción del tumor de los antagonistas de TNF- α se espera la modulación de la función de las células T reguladoras y reducción de la respuesta inflamatoria en Th17 [157]. Varios anticuerpos anti-TNF- α están siendo actualmente probados en ensayos clínicos, así como: infliximab [158], etanercept y adalimumab [156]. Sin embargo, dos problemas persisten después de una serie de optimizaciones de los anticuerpos para uso humano: (1) el modo de administración asociado con dificultades de dosificación, y (2) el elevado costo del tratamiento; sin embargo se mantiene la búsqueda de herramientas terapéuticas alternativas como el caso de la oleandrina, UNBS1450, un glucósido cardiotónico, obtenido de *Nerium oleander*, capaz de bloquear el TNF- α , en una variedad de células, tales como U937, ovario CaCOV3, células HeLa y Jurkat [159].

Otro promotor de tumores es la IL-6, un efector de Ras, el cual está implicado en varios cánceres humanos, incluyendo mieloma múltiple y carcinoma hepatocelular [160]. La IL-6 bloquea las señales de apoptosis, y en el microambiente del tumor induce a genes que promueven la proliferación celular y la angiogénesis [157]. Varios ensayos están en marcha para probar anticuerpos de acción anti-IL-6 y su receptor, un ejemplo es el siltuximab (CNTO 328), el cual puede neutralizar la

función de IL-6 y reducir la incidencia de cánceres tipo linfoma, mieloma o renal [161].

Debido a que el NF- κ B juega un papel crítico en la tumorigénesis y en la inducción de la resistencia de las células tumorales a la terapia actualmente disponible, los inhibidores de estas vías tienen un enorme potencial [162-164]. Varios inhibidores de NF- κ B han sido desarrollados por diseño racional o por identificación a partir de productos naturales [146]; para la inhibición de NF- κ B existen varias vías entre las que podemos citar: 1) inhibidores de STAT3, 2) inhibidores de IKK, 3) inhibidores de JAK2, 4) Compuestos naturales y sus derivados [165]. Dentro de este último grupo se encuentran los derivados sintéticos triterpenoides del ácido oleanólico y ursólico, el ácido 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oico (CDDO), su C-28 metil éster (CDDO-Me) y el derivado imidazol C28 (CDDO-Im), los cuales son potentes agentes antiinflamatorios [166] y antitumorales [167]. La inhibición de la señalización de NF- κ B parece ser un mecanismo molecular esencial que sustenta los efectos terapéuticos de CDDO y sus derivados [168].

Otros inhibidores de IKK son la talidomida y sus análogos, clasificados como fármacos inmunomoduladores que han mostrado resultados prometedores en el tratamiento del mieloma múltiple [169], su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de IKK. El trióxido de arsénico (As_2O_3) es un antitumoral, utilizado en ensayos clínicos contra la leucemia promielocítica y tumores sólidos. Entre otras de las vías de señalización que pueden estar implicadas en su efecto antitumoral, el As_2O_3 ha demostrado inhibir IKK mediante la unión a la cisteína-179 en la activación de bucle de la subunidad catalítica de la enzima [170].

El conocimiento de la correlación existente entre la inflamación y el desarrollo de tumores ofrece nuevos y novedosos candidatos para la intervención terapéutica, en combinación con enfoques terapéuticos más convencionales tales como la quimioterapia, la radioterapia y la terapia dirigida, pero no tan independientemente como la monoterapia [165].

En la figura 3 se esquematizan algunos de los enfoques terapéuticos para el tratamiento de células tumorales de acuerdo con los 4 nuevos hitos de la célula tumoral.

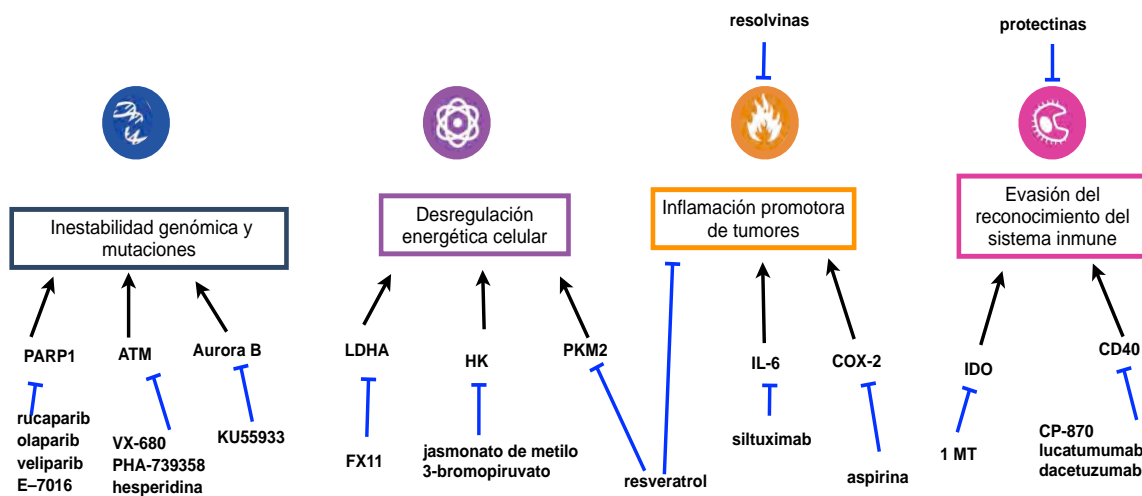


Figura 3. Enfoque terapéutico de los hitos de la célula tumoral (Parte 2)

La diferencia más importante entre la búsqueda de los denominados citotóxicos clásicos y los fármacos dirigidos, es que los citotóxicos clásicos persiguen como resultado final “la muerte de las células tumorales” mientras que en el dirigido se ha seleccionado un blanco determinado sobre el cual actúe el fármaco, y mediante este efecto se produzca la muerte celular. Sin embargo, las características de una célula tumoral se entrecruzan, tanto en las vías de

activación como de control, y por lo tanto, un agente terapéutico actúa sobre varias vías a la vez, razón por la cual es muy complicado clasificar los fármacos de acuerdo con un proceso característico como ya lo hemos visto. Muchos de los fármacos utilizados actualmente en la quimioterapia del cáncer provienen de fuentes naturales.

1.2 Plantas medicinales de Ecuador con potencial anticáncer y su composición química

Actualmente existen varios tratamientos curativos y paliativos para el cáncer; los tratamientos curativos tienen como objetivo común la erradicación de las células tumorales; entre ellos podemos citar la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia, o incluso la terapia génica [171]. Dentro de los tratamientos más utilizados se encuentra la quimioterapia, que como su nombre lo indica implica la utilización de una serie de compuestos químicos, ya sean naturales o sintéticos para combatir esta enfermedad; estos compuestos reciben el nombre genérico de antineoplásicos, los cuales pueden ser utilizados solos o generalmente en combinación con otros. Los metabolitos secundarios aislados de microorganismos, plantas y especies marinas entre otras, han sido una fuente importante de sustancias bioactivas [172]. De los fármacos aprobados por la FDA para tratar el cáncer, aproximadamente el 66% son metabolitos secundarios, análogos semi-sintéticos o sintéticos basados en farmacóforos obtenidos de metabolitos secundarios [173].

La producción de los metabolitos secundarios se ve favorecida por un microambiente diverso. Uno de los países con enorme diversidad biológica es Ecuador, existen aproximadamente 20,000 especies vegetales, de las cuales el 20% son endémicas [174]. Además, Ecuador continental es la tercera región a nivel mundial con mayor densidad de especies vegetales endémicas [175].

Ecuador es el país donde se encuentran las especies vegetales con mayor actividad citotóxica contra líneas de cáncer humano, comparado con otros países de similar diversidad biológica como son Indonesia, República Dominicana, Tailandia y Perú [176]. Otro aspecto importante de Ecuador es el conocimiento etnomédico de muchas de sus comunidades indígenas. En las secciones posteriores revisaremos varias especies vegetales, su información etnomédica, moléculas activas aisladas y estudios que validan su eficacia, para lo cual las hemos clasificado en dos grandes grupos: especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada y especies de origen ecuatoriano con potencial anticancerígeno.

1.2.1 Especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada

Diversos estudios han informado la utilización por grupos étnicos en Ecuador de especies vegetales existentes contra el cáncer, varios de ellos han sido resumidos en la Tabla 1, algunas de estas especies son endémicas de Ecuador, sin embargo también se incluyen especies de la región o de distribución mundial. A continuación revisaremos algunas de las especies de la Tabla 1, de las cuales se ha estudiado su uso antitumoral, ya sea de los extractos obtenidos o de los metabolitos secundarios aislados (Figura 4).

Tabla 1. Especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta utilizada	Ref
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Hinojo, anís, eneldo, hinojo común	Hoja, flor	[177]
	<i>Prestonia mollis</i> Kunth.	Bejuco del Cáncer; Arachillas, betilla, falso condurango, sánalo todo, malacapa	Raíz, tallo hoja	[177]
Apocynaceae	<i>Marsdenia condurango</i>	Condurango	Corteza, hoja	[177]
Asteraceae	Rchb. f.			
	<i>Aristeguietia glutinosa</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob	Matico; <i>Chusa lunku</i> , <i>Hierba del soldado</i> , <i>Matico silvestre</i> , <i>Melga</i> , <i>Migla</i>	Hoja	[178]
Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	Monte del aire; Chukri yuyu, paki panka, pichi panka, raku panka (kichwa) llaga panka,	Tallo, hoja	[177]
Crassulaceae	<i>Echeveria quitensis</i> (Kunth.) Lindl.	Condorcol; siempre viva; cundur cul	Hoja	[177]
Equisetaceae	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Caballo chupa; Sukillu, cola de caballo, hierba platero, tubakavache	Tallo	[178]
Euphorbiaceae	<i>Croton lechleri</i> Mull.Arg	Sangre de drago, Tulan wiki, tulan yura, yawar kaspi, yawar wiki, yawar wiki panka (Kichwa),	Latex	[179]
Fabaceae	<i>Crotalaria sp.</i> L.	Fenogreco	Hoja	[177]
Fabaceae	<i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms	Chaquino; bálsamo kara, sesepëquësoquë (pai coca), yemenga tanoe (Wao tededo), chikawinia (shuar chicham),	Corteza	[177]
Fabaceae	<i>Senna multiglandulosa</i> (Jacq.) H.S. Irwin & Barneby	Chinchín		[178]
Malvaceae	<i>Lavatera arborea</i> L.	Malva; Puka malva, malva blanca	Tallo, corteza	[178]
Olacaceae	<i>Minquartia guianensis</i> Aubl.	Wayakan chi, yatyutya, chi jaki (chafi'ki), wanpula, yura wanpula (kichwa), seña'mba quini cco,tsindo'cho (a'ingae), yaji siu (pai coca), kayeyakawe, kobakadetapo, kobakadewe (wao tededo), paini (shuar chicham), cuayacán, palo de barbasco	Corteza	[180]
Polygalaceae	<i>Monnina obtusifolia</i> H.B.K.	Iwilan (kichwa), reloj de campo, sagitaria	Partes aéreas	[179]
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	Níspero; <i>Níspero del Japón</i> , <i>Míspero</i>	Hoja	[178]
Rubiaceae	<i>Uncaria tomentosa</i> (Will.) DC.	Uña de gato; eygawe (wao tededo), kenkuk (shuar chicham),	Corteza	[177]

***Uncaria tomentosa* (Willd) DC (Rubiaceae)**

Es una liana nativa de Ecuador, se distribuye a lo largo del Litoral y de la Amazonía. Se registran colecciones en las provincias de Napo, Orellana, Sucumbíos y Zamora Chinchipe desde los 0 a los 900 m s.n.m [181]. Conocida también como uña de gato, con distribución en Sur América y Asia, es conocida por su uso en medicina tradicional tanto por los indígenas ecuatorianos [177] [182], como peruanos y bolivianos [183] así como en la población asiática para tratar verrugas, úlceras, dolores de cabeza, problemas intestinales e infecciones bacterianas y fúngicas [184]. Los extractos orgánicos como los acuosos de *U. tomentosa* contienen metabolitos secundarios activos tales como los alcaloides de tipo oxoindólico, proantocianidinas, triterpenos, esteroides y flavonoides. Dentro de los alcaloides de tipo oxindole, están la isopteropodina (1), isomitrafalina (2), pteropodina (3), y uncarina F (4); todos con actividad citotóxica en CCRF-CEM-C7H2, línea leucémica de linfocitos T; además tanto la pteropodina como la uncarina F, son capaces de inducir apoptosis [185]. Aunque la mitrafalina (5) ha demostrado no ser activa en la línea CCRF-CEM-C7H2 [185], tiene actividad citotóxica en líneas celulares humanas de glioma y neuroblastoma con una IC₅₀ entre 12 y 40 µM [186]. Mientras que los alcaloides isopteropodina y pteropodina inhiben el crecimiento de células MTC-SK, carcinoma medular de tiroides y producen apoptosis mediada por caspasas [187]. En modelos *in vivo* de ratón, diferentes extractos orgánicos, así como extractos enriquecidos de alcaloides provenientes de *U. tomentosa* son capaces de inducir apoptosis en células

leucémicas HL-60 [188-192]. Así también los extractos con alcaloides son capaces de inhibir el crecimiento de xenotrasplantes de cáncer cervicouterino (HeLa), de cáncer de colon (HCT116 y SW480), afectando la vía de señalización de Wnt [193]. Sheng et al. (2007) informaron que el extracto acuoso de esta planta induce citotoxicidad mediada por apoptosis en líneas celulares leucémicas humanas HL-60, K-562 [188].

Además, varios estudios sustentan la actividad antiinflamatoria presentada tanto por extractos de esta especie como de algunos componentes de los mismos, los cuales podrían ayudar tanto a la prevención como a potenciar el efecto contra células tumorales al estimular el sistema inmunológico [184, 194].

***Croton lechleri* Müll. Arg (Euphorbiaceae)**

Perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, en Ecuador presenta una amplia distribución en los Andes y la Amazonia. Se registran colecciones en las provincias de Carchi, Esmeraldas, Loja, Morona Santiago, Napo, Orellana, Pastaza, Sucumbíos, Tungurahua y Zamora Chinchipe desde los 0 a los 2000 m s.n.m. [181]. Es una planta medicinal tradicional que produce una savia roja, conocida como "Sangre de Drago" que se obtiene al tallar la corteza de las plantas que tienen dos, tres o más años [195]. Nativos amazónicos utilizan esta savia para la cicatrización de heridas, y para tratar enfermedades gastrointestinales y cánceres [178,196]. La savia como tal ha sido capaz de inhibir células de leucemia mieloide K562 [197], al igual que inhibe la proliferación celular a partir de 1 mg/mL en las células de melanoma SK23, mientras que a concentraciones 10 veces más altas inhibe el crecimiento de células de cáncer de colon HT-29 y la línea celular

de cáncer de colon LoVo [198]. Utilizando microscopía confocal se observó que 1 mg/mL de la savia de *Croton lechleri* causa la pérdida de la estructura de microtúbulos en las células SK23 [198].

La caracterización fitoquímica de la savia ha llevado a la conclusión de que las proantocianidinas oligoméricas y los flavonoles constituyen casi el 90% del peso seco. Han sido aislados diterpenos de tipo clerodano como korberin A y korberin B [199]. En menor proporción se ha encontrado un alcaloide denominado taspina (6), presente en otras plantas como *Radix y Rhizoma leonticis*, se ha demostrado que la taspina inhibe la proliferación de las células de melanoma SK23 y colon HT29 [198]. La taspina también puede inhibir la proliferación de células epidermoides de carcinoma A431 e inducir la apoptosis relacionada con activación de la caspasa-3 y la regulación de la relación de Bax/Bcl-2 [198].

Taspina y algunos de sus derivados pueden inhibir significativamente la proliferación celular de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular, que es crucial para la angiogénesis [200]. También su derivado HMQ1611, tiene un efecto citotóxico en células de cáncer de mama y en xenotransplantes en ratones. Los efectos inhibitorios de HMQ1611 en células de cáncer de mama al parecer son a través de la vía ERα, y EGFR/MAPK y EGFR/PI3K/AKT [201].

***Marsdenia condurango* Rchb. f. (Apocynaceae)**

Llamado también *Gonolobus condurango*, pertenece a la familia de las Apocynaceae, es una liana nativa de Ecuador, se distribuye a lo largo de los Andes y la Amazonia. Se registran colecciones en las provincias de Azuay, El Oro,

Guayas, Loja, Zamora-Chinchipec desde los 1000 a los 2000 m s.n.m. [181]. Es utilizada en medicina tradicional para tratar cáncer, sífilis y para procesos inflamatorios [177]. De la corteza del condurango han sido aislados algunos pregnanos glicosilados [202-204], el componente mayoritario descrito para los extractos de la corteza es el condurango glicosilado A (7), el mismo que es capaz de inducir daño en el ADN con una reducción en la viabilidad celular de las células de cáncer cérvico uterino (HELA), y activar p53 por inducción de especies reactivas de oxígeno ROS, e inducir muerte celular a través de apoptosis [205]. Aunque hay pocos metabolitos secundarios aislados que por sí solos hayan presentado actividad antitumoral existen varios informes que en tinturas y otros fitofármacos han sido efectivos [206].

***Senna multiglandulosa* (Jacq.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae)**

Es un arbusto nativo de Ecuador, se distribuye a lo largo de los Andes. Se registran colecciones en las provincias de Azuay, Carchi, Chimborazo, Imbabura, Napo, Pichincha y Tungurahua desde los 2000 a los 3500 m s.n.m. De esta especie se han aislado emodina (8) y cuatro biantraquinonas [207]. La emodina, es una molécula citotóxica bastante estudiada, capaz de inducir la apoptosis y detener el crecimiento en varias líneas celulares de cánceres humanos: pulmón, cérvico uterinos [208][209], de leucemia [210], de hepatoma, y de cáncer próstata [211], de mama que sobreexpresa HER-2/neu [212], actuando como un inhibidor de tirosina cinasa [213]. También se ha planteado, como estrategia innovadora, el uso de esta molécula para aumentar la susceptibilidad de las células tumorales a los agentes terapéuticos citotóxicos [214], ya que la emodina es un generador

de especies reactivas de oxígeno [215].

***Bryophyllum pinnatum*,(Lam) Oken (Crassulaceae)**

Es una hierba o subarbusto introducido y cultivado en Ecuador. Se registran colecciones en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Galápagos, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Manabí, Napo, Pichincha desde los 2000 a los 3000 m s.n.m [181]. Se utiliza en la medicina tradicional de varios países India, México, Nicaragua entre otros [216]. En Ecuador constituye una planta muy comúnmente cosechada pero además de gran importancia en la vida cotidiana de los Kichwa [217]. *B. pinnatum* es utilizada para curar diversas infecciones, enfermedades intestinales, la cicatrización de heridas y otras dolencias. Se han aislado bufadienolides como briofillina A (9) y briofillina B (10), además del acetado de 3-bersaldegenina. Las briofillina A y B, presentan actividad citotóxica en varias líneas tumorales, es importante recalcar que el Briofillina B ha mostrado potente citotoxicidad *in vitro* en células de cáncer cérvico uterino KB con una ED₅₀ de 80 ng/mL [218, 219]. También el extracto de cloroformo de las hojas inhibe el crecimiento de las células HELA además de ser un anti-HPV [220].

***Minquartia guianensis* Aubl (Olacaceae)**

Árbol nativo de Ecuador. Se distribuye en el Litoral, los Andes, y la Amazonía, se registran colecciones en las provincias de Esmeraldas, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Sucumbíos, Tungurahua, desde el nivel del mar hasta los 2000 m s.n.m. [181]. Según la información etnomédica sirve para tratar cáncer de pulmón. De la corteza de la raíz de esta planta se han aislado eritrodiol, ácido betulínico, ácido

palmítico, ácido mirístico y ácido esteárico, pero el componente en mayor proporción es el ácido minquartinoico (**11**) [180], este último ha demostrado presentar actividad citotóxica en aproximadamente diez líneas celulares humanas, con una DE₅₀ entre 1,6 y 5,5 ug/mL [221]. A partir de este ácido se han desarrollado algunos derivados con el fin de incrementar su actividad no sólo como anti-tumoral sino con propiedades antivirales y parasitarias [222-224].

De las hojas de esta planta, se han aislado triterpenos como taraxerol (**12**), lupeol, lupen-3-ona, y esqualeno [225]. El taraxerol es conocido por sus propiedades antiinflamatorias, lo que podría contribuir al efecto a las propiedades atribuidas en la medicina tradicional.

***Monnina obtusifolia* Kunth (Poygaleceae)**

Arbusto nativo de Ecuador, se distribuye en los Andes. Se registran colecciones en las provincias de Bolívar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pastaza, Pichincha, Tungurahua, desde 1500 hasta los 4000 m s.n.m. [181]. Usada como agente antitumoral. En la angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es importante en la metástasis y crecimiento del tumor [226]; el extracto de n-BuOH obtenido de las hojas de *Monnina obtusifolia*, inhibe el VEGF-A o la interacción factor de crecimiento placentario con Flt - 1 (VEGF receptor de 1) [227].

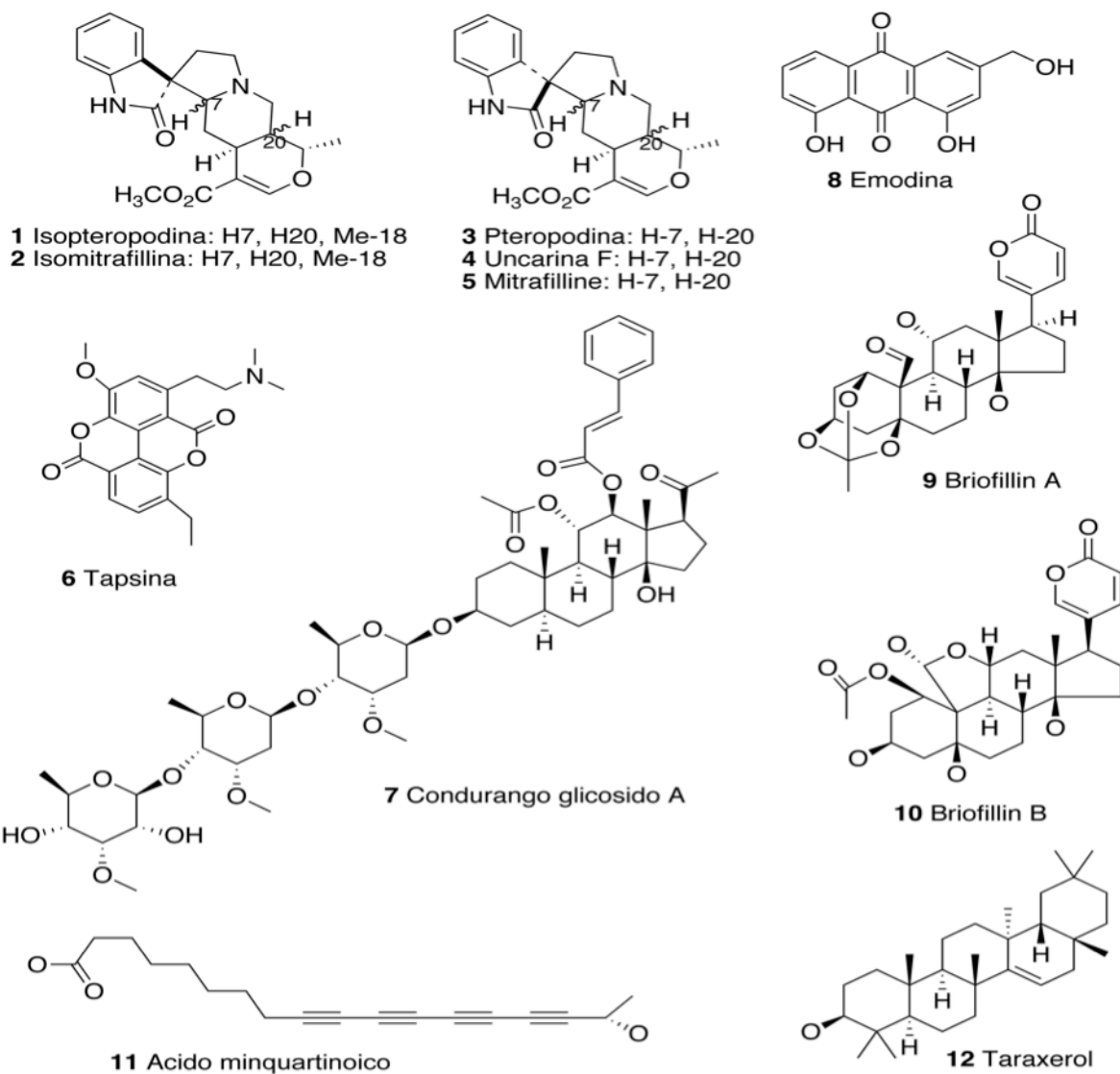


Figura 4. Estructuras químicas aisladas de especies etnomédicas con actividad anti-tumoral informada.

1.2.2 Especies de origen ecuatoriano con potencial anticáncer

En este grupo de plantas contemplamos aquellas que según la medicina tradicional ecuatoriana se han usado para distintos malestares, además estudios

actuales demuestran que sus componentes (Figura 5 y 6) son eficaces para tratar algunos tipos de cáncer.

***Cinchona officinalis* L (Rubiaceae)**

Arbusto u árbol perteneciente a la familia Rubiaceae, nativo de Ecuador, se distribuye en los Andes. Se registran colecciones en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Chimborazo, El Oro, Loja, Morona-Santiago, Zamora-Chinchipe, desde los 1000 hasta los 3500 m s.n.m [181]. La corteza de la *Cinchona spp.* fue utilizada legendariamente por los Paltas en Ecuador como agente anti-febril, fue introducida a Europa en el año 1640 [228]. La corteza dominó la terapia de la malaria en Europa hasta 1820, cuando se aisló la quinina (**13**) pura y junto a su derivado la cloroquina (**14**) han sido empleadas ampliamente contra el paludismo. Sin embargo varios alcaloides aislados de *C. officinales* y análogos han sido citotóxicos efectivos en diversas líneas celulares [229]. En el caso de la cloroquina ha demostrado ser efectiva contra varias líneas celulares sobre todo en aquellos cánceres en donde el pH es bajo, además de inducir apoptosis y autofagocitosis [230]. La quinidina (**15**), otro alcaloide en gran proporción en la *C. officinalis* promueve la detención del ciclo celular en G1/G0; causando acumulación de gotas de lípidos en la membrana y la ampliación del citoplasma, permitiendo la diferenciación celular [230]. Además se ha reportado la síntesis de alcaloides de *Cinchona* conjugados con fluorocromos con propiedades citotóxicas en la línea celular KB y a la vez pueden ser utilizados como marcadores [231]. A inicios de los años noventa se demostró que los alcaloides de quinina eran capaces de revertir los efectos de resistencia celular a las antraciclinas y a la

doxorubicina [232, 233], siendo hasta la actualidad utilizados como inhibidores de los transportadores de ATP [234]. Tanto la cloroquina como la 3-hidroxiquinolina (16), están siendo probados en fase clínica I y II para el tratamiento en combinación con distintos fármacos, ya que existe un sinergismo y una cierta selectividad de inducción de apoptosis de células del cáncer de pulmón, mama y glioblastoma.

***Annona squamosa* L., *A. montana* Macfad y *A. muricata* L (Annonaceae)**

Las tres especies han sido utilizadas en medicina tradicional para el reumatismo, pertenecen a la familia de las Anonáceas, ampliamente distribuida en las regiones tropical y sub-tropicales. *A. squamosa* es un árbol cultivado en Ecuador, se distribuye en la Costa. Se registran colecciones en la provincia de Guayas, desde los 0 hasta los 500 msnm. *A. muricata* es un árbol nativo y cultivado en Ecuador, se distribuye en Galápagos, el Litoral y la Amazonia. Se registran colecciones en la provincia de Esmeraldas, Galápagos, Guayas, Imbabura, Los Ríos, Manabí, Morona-Santiago, Napo, desde los 0 hasta los 500 msnm. *A. montana* es un árbol nativo de Ecuador, se distribuye en el Litoral y la Amazonia. Se registran colecciones en la provincia de Esmeraldas, Guayas y Napo, desde los 0 hasta los 500 msnm. Los metabolitos secundarios más representativos de las especies de esta familia son las acetogeninas (ACGs), se han aislado por lo menos cuatrocientas [235]. Las ACGs se caracterizan por poseer una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo inmunosupresores, plaguicidas, antisedantes, antipalúdicos, así como citotóxicos antitumorales [235, 236]. El mecanismo de acción por el cual son citotóxicas está relacionado con la inhibición del complejo I

en el sistema de transporte de electrones en la mitocondria [237]. Las ACGs también inhiben la NADH oxidasa que se encuentra en la membrana plasmática de las células tumorales. El efecto inmediato es la disminución de los niveles de ATP [238, 239]. La alta demanda de ATP por las células del tumor podría explicar la sensibilidad de cultivos de carcinoma y líneas celulares a los inhibidores del complejo I [240], además sugiere que las ACGs podrían ser excelentes candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales, incluso más efectivos en los tumores resistentes a múltiples fármacos (MDRs) debido al flujo de la bomba de ATP [238]. La mayoría de los estudios sobre la actividad antitumoral de ACGs se llevan a cabo en cultivos de células tumorales, lo impresionante de estos compuestos es que su IC₅₀ se encuentra entre 10⁻⁶ y 10⁻¹⁴ M. De la *A. squamosa* se han aislado escuamocina (**17**) y bullatacina (**18**), las cuales han demostrado inducir apoptosis en distintos tipos de líneas celulares [241-244]. La bullatacina, también ha sido efectiva en xenotransplantes tanto en células tumorales MCF-7 como en MCF-7/DXO células resistentes a doxorubicina. De la *A. muricata* también se han aislado otras acetogeninas efectivas en diversas líneas celulares tumorales como la montecristina (**19**), cohibina A (**20**), murihexocina (**21**) arianacina (**22**) entre otras [238, 245-246]. El extracto de *A. muricata* reduce la viabilidad de células de cáncer de páncreas e induce necrosis y detención del ciclo celular [247].

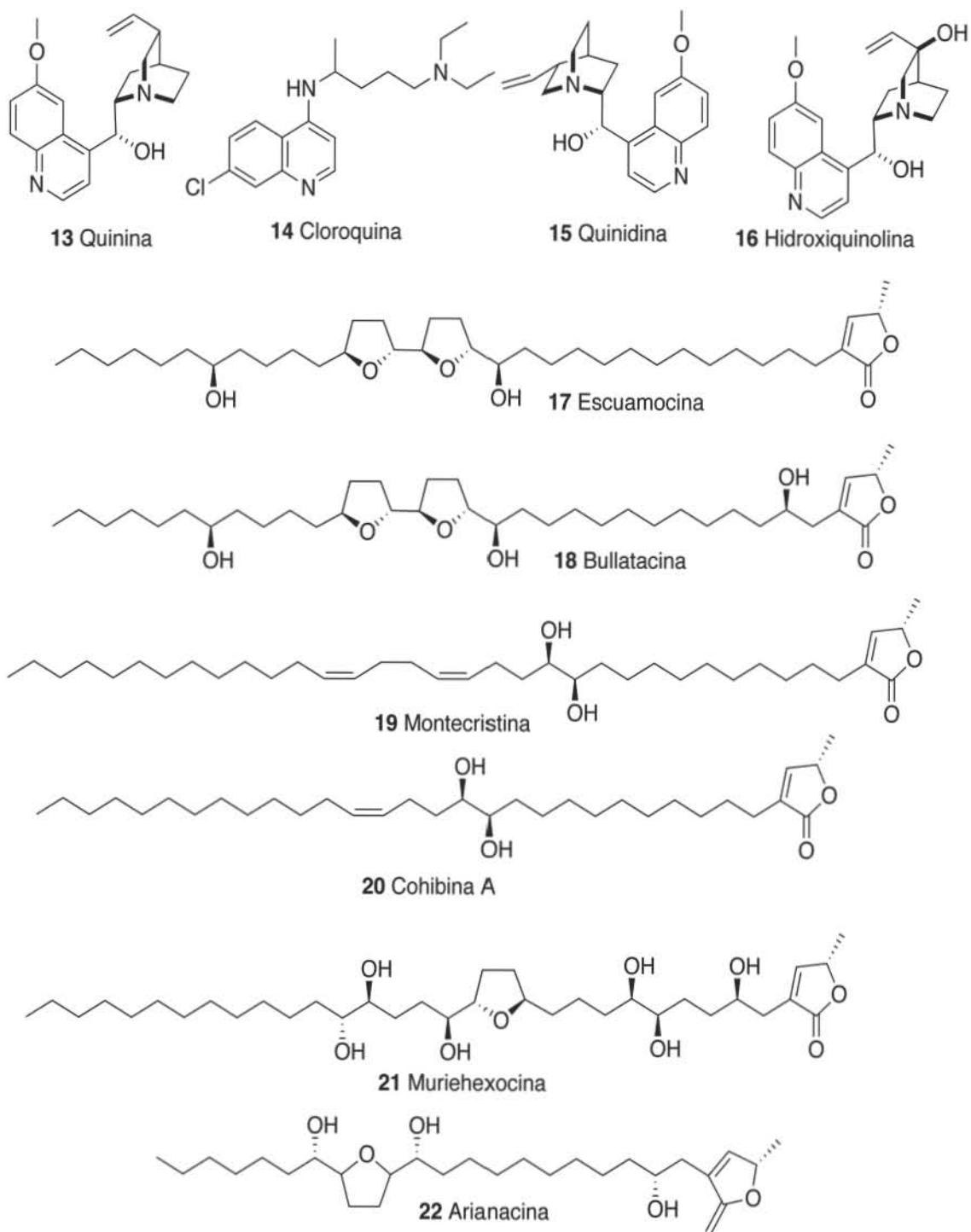


Figura 5. Estructuras químicas aisladas de especies de origen ecuatoriano con potencial anticáncer. Parte I. Moléculas de la 13 a la 22.

***Licania intrapetiolaris* Spruce ex Hook. f. (Chrysobalanaceae)**

Árbol de la amazonia ecuatoriana, perteneciente a la familia Chrysobalanaceae. Se registran colecciones en la provincia de Sucumbíos. De esta especie se aislaron por primera vez la intrapetacina A (**23**) y la intrapetacina B (**24**), diterpenoides de tipo clerodano, los cuales fueron efectivos en células KB [248]. Además también se reportó la presencia de un triterpeno bastante potente, la cucurbitacina B (**25**) [248], con actividad citotóxica comprobada en varias líneas celulares [249, 250]. La cucurbitacina B es capaz de inhibir el ciclo celular [251], además de ser inhibidor de varias vías de señalización del cáncer [250, 252].

***Casearia sylvestris* Sw.(Flacourtiaceae)**

Es un arbusto u árbol perteneciente a la familia Flacourtiaceae, nativo de Ecuador, se distribuye en el Litoral, los Andes y la Amazonía. Se registran colecciones en las provincias de Carchi, El Oro, Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Zamora-Chinchipe, desde el nivel del mar hasta los 2000 m s.n.m. [181], es utilizada en la medicina tradicional de Colombia para tratar tumores [179]. De muestras recogidas en Ecuador se aislaron por primera vez las caseavestrinas A (**26**), B (**27**) y C (**28**); con actividad antitumoral en líneas celulares: cáncer de pulmón (LX-1), cáncer de colon (HCT116) y cáncer de ovario (A2780) [248]. De esta especie se han aislado también casearinas con actividad antitumoral, entre las que podemos recalcar la Casearina X (**29**), que muestra efectos citotóxicos contra la línea leucémica HL-60, con una Cl_{50} de 0,4 uM y disminuyen su proliferación e inducen apoptosis [253].

Dos compuestos derivados del ácido gálico, han sido aislados de las hojas de *C. sylvestris*: el isobutil éter de epigalocatequina-3,5-dimetil (IGDE) (**30**) y éter metil galato-3,5-dimetil (MGDE) (**31**), los que mostraron actividad antitumoral en modelos de xenotransplantes de células de cáncer de pulmón [254].

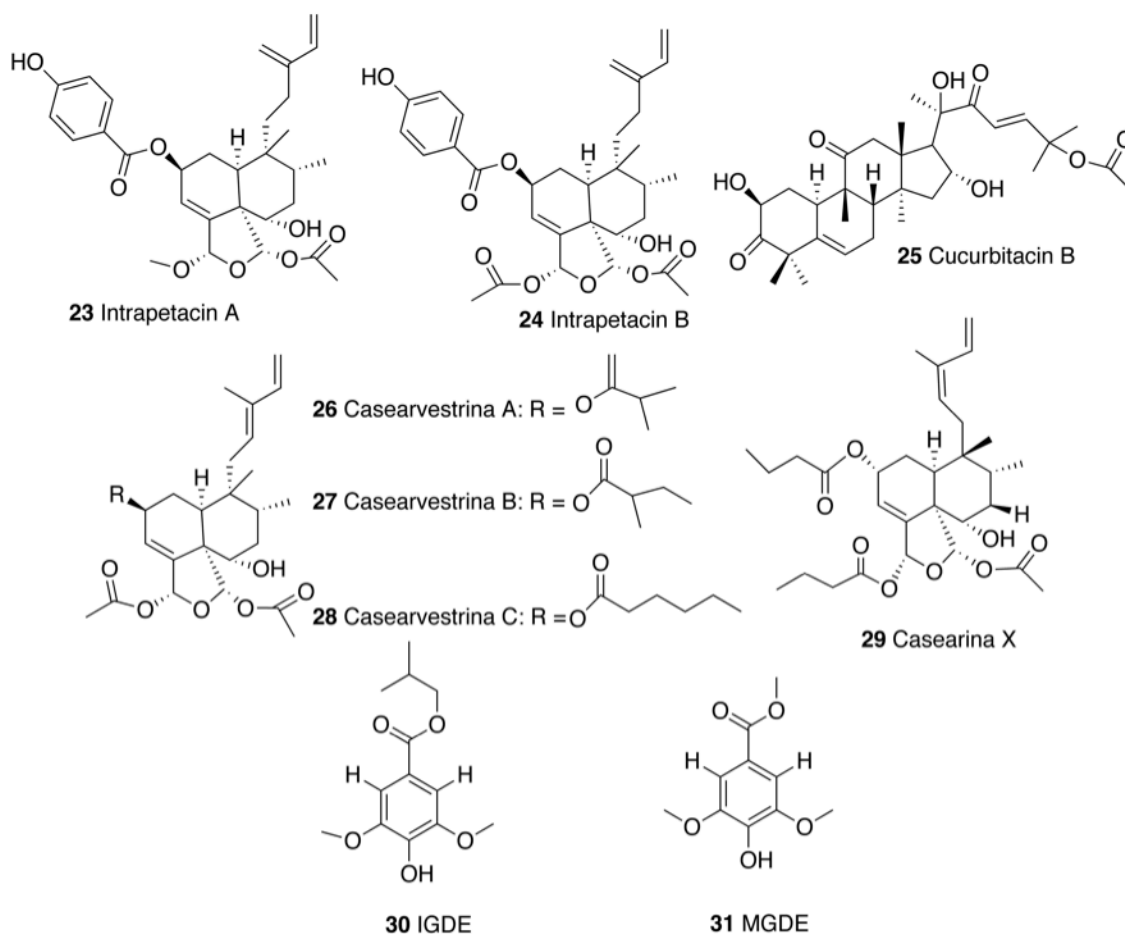


Figura 6. Estructuras químicas aisladas de especies de origen ecuatoriano con potencial anticáncer. Parte II. Moléculas de la 23 a la 31.

Es claro que en Ecuador existe una gran variedad de especies vegetales que deriva en una mayor diversidad química presente, así mismo los pocos estudios

hasta ahora realizados han demostrado el gran potencial de uso contra el cáncer de las especies vegetales utilizadas tradicionalmente por diversas etnias no solo ecuatorianas.

1.3 Ensayos de muerte celular para el descubrimiento de fármacos

La muerte celular tiene un papel importante tanto en el proceso del cáncer como en estrategias dirigidas a la modulación de las vías asociadas. Además de cuantificar la muerte celular, es muy importante discriminar entre el efecto citotóxico y citostático del compuesto y además precisar cómo los potenciales fármacos puede modular la muerte celular [255]. La identificación de los procesos de muerte es necesaria por al menos dos razones: Primero, los agentes altamente selectivos (es decir, los agentes con un blancos o unos pocos blancos) son menos propensos a provocar efectos secundarios que los compuestos que se dirigen a clases enteras de proteínas. En segundo lugar, hay varios casos en los que la activación o inhibición de una modalidad de la muerte celular específica sobre los demás podrían ser clínicamente deseable.

1.3.1 Ensayos sobre la muerte celular

Las células deben ser consideradas como muertas cuando se cumplen al menos uno de los siguientes criterios: 1) ha perdido la integridad de la membrana plasmática, 2) la célula se ha fragmentado en cuerpos apoptóticos o en restos celulares o 3) sus fragmentos han sido tomado por células vecinas. Además, como las células que mueren pierden todas las funciones, una disminución en el metabolismo se puede observar en el nivel de la población celular. Por lo tanto, los ensayos de muerte celular se dividen en dos grandes grupos: ensayos que miden fielmente la muerte celular, y pruebas que cuantifican la bioquímica de procesos que son vistos como marcadores sustitutos de viabilidad. Existen múltiples

técnicas disponibles actualmente para evaluar la muerte celular, ya sea directa o indirectamente a través de marcadores sustitutos.

- **Colorantes vitales**

Los medios más comunes de la evaluación de la muerte de las células cultivadas es proporcionado por colorantes vitales, que son moléculas fluorescentes o de color que discriminan entre células vivas y muertas. Los colorantes vitales más frecuentemente utilizados en citofluorometría (debido a su poder estadístico intrínseco) incluyen los denominados colorantes de exclusión, que no pueden atravesar la membrana plasmática intacta. Por ejemplo, el yoduro de propidio o el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) distinguen únicamente las células muertas. Por el contrario, los sustratos fluorogénicos de esterasa, por ejemplo, acetato de fluoresceína, (FDA) [256] se puede utilizar para etiquetar selectivamente las células vivas. Esto es posible porque estos compuestos lipófilos, no fluorescentes, que penetran fácilmente en las células, se hidrolizan por esterasas intracelulares para generar productos fluorescentes impermeables a la membrana y del plasma, que luego son retenidos exclusivamente por células vivas. Sin embargo, aunque los colorantes de exclusión pueden proporcionar información de artefactos, la actividad enzimática intracelular de esterasas puede verse afectada por fenómenos celulares de muerte-no-relacionada.

No está demás mencionar la prueba clásica de medición de la viabilidad por exclusión del colorante azul de tripano, que se utiliza de rutina para determinar la viabilidad celular.

- **Proteínas intracelulares**

La ruptura de la membrana plasmática también puede ser bioquímicamente cuantificada midiendo el contenido de las proteínas intracelulares (más a menudo enzimas) en sobrenadantes de cultivo celular [257]. Por ejemplo, existen *kits* para fluorimetría o la detección colorimétrica de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G6PD) y lactato deshidrogenasa (LDH) [257] disponibles comercialmente. Sin embargo, un inconveniente principal de estas técnicas es que la actividad de estas enzimas puede ser afectada por parámetros fisicoquímicos (por ejemplo, cambios en el pH del medio de cultivo o los efectos secundarios de los inhibidores farmacológicos) y la actividad enzimática puede decaer con el tiempo en el medio extracelular [258].

- **El metabolismo celular**

El marcador bioquímico, sustituto de la viabilidad más ampliamente utilizado es el ATP, basado en el supuesto de que las células vivas producen ATP y es indispensable para la vida celular. Ensayos basados en luciferasa permiten la cuantificación sensible del ATP intracelular. Sin embargo, la disminución de las concentraciones intracelulares de ATP pueden resultar de perturbaciones no letales, incluyendo el cese de la proliferación (por ejemplo, debido a la senescencia, falta de nutrientes o la inhibición de contacto) y la inhibición de la respiración mitocondrial. Por lo tanto, la medición de ATP no siempre se correlaciona directamente con la viabilidad celular.

Varios ensayos que miden las facetas específicas del metabolismo celular se han utilizado ampliamente para controlar la viabilidad, incluyendo la bien conocida

prueba del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio (MTT) [259]. El MTT y otros derivados son sales de tetrazolio incoloros que se absorben fácilmente por las células vivas y transformados por reductasas mitocondriales en compuestos de colores que son fáciles de cuantificar midiendo su absorbancia utilizando un espectrofotómetro. Desafortunadamente, al igual que los ensayos basados en ATP, una serie de otros factores pueden inhibir a las reductasas mitocondriales, lo que implica que la conversión de los derivados de tetrazolio *per se* puede proporcionar información inequívoca sobre la viabilidad celular [260].

Ensayos basados en ATP y en MTT son altamente susceptibles a la interferencia metabólica; por consiguiente, pueden generar resultados falsos positivos. Así, aunque pruebas orientadas al metabolismo son muy útiles para obtener información preliminar, los resultados deben ser validados en pruebas secundarias basadas en marcadores de muerte celular más precisos [261]. Independientemente de estas cuestiones, probablemente sean de los ensayos más utilizados. La conversión de MTT se ha explotado para cribar más de 5600 compuestos a partir de varias bibliotecas disponibles en el mercado, lo que llevó a la identificación de la camptotecina como un agente que es altamente activo contra rhabdomyosarcoma alveolar [262].

- **Unión celular**

El grado de unión de las células al sustrato de cultivo también ha sido propuesto como un marcador de la viabilidad *in vitro*. La mayoría de las células no hematopoyéticas se adhieren firmemente a un sustrato de cultivo adecuado, mientras que las células lesionadas completan progresivamente y, finalmente, se

separan, lo que coincide con la muerte celular. Sobre la base de estas observaciones, placas de múltiples pocillos con microelectrodos que miden la impedancia de la superficie ocupada por las células, se han propuesto como un indicador indirecto de viabilidad. Hay dos ventajas principales de esta técnica: En primer lugar, permite determinaciones no invasivas y en segundo lugar, permite la monitorización en tiempo real. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que podría estar influenciado por factores que no están relacionados con la muerte celular, como por ejemplo, los cambios en la morfología celular y los cambios en la polarización de la membrana plasmática.

1.3.2 Ensayos de identificación de tipo de muerte celular

La homeostasis se mantiene en los organismos multicelulares por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. La muerte celular se puede clasificar de acuerdo con su apariencia morfológica por criterios enzimológicos, aspectos funcionales o características inmunológicas [259]. Desde el punto de vista morfológico podríamos describir a la apoptosis, necrosis, autofagia, senescencia y catástrofe mitótica.

La apoptosis es un proceso fisiológico de “suicidio celular” que es esencial para el desarrollo embrionario, la función normal del sistema inmunitario y el mantenimiento de la homeostasis de tejidos en organismos multicelulares [27]. La desregulación de la apoptosis se ha implicado en numerosas condiciones patológicas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias y el cáncer [263]. Este tipo de muerte celular está caracterizada

principalmente por la contracción celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación de la célula; esto da como resultado la formación de cuerpos apoptóticos que luego son absorbidos por las células fagocíticas [264]. Otra característica de la apoptosis es el movimiento de la fosfatidilserina (PS) lipídica del interior al exterior de la membrana plasmática, donde funciona entonces como una señal para el reconocimiento llevado a cabo por las células fagocíticas [27].

La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por una ganancia en el volumen celular, hinchazón de los orgánulos, ruptura de la membrana plasmática y la consiguiente pérdida de contenido intracelular [265]. Durante mucho tiempo, la necrosis fue considerada como una simple forma accidental incontrolada de la muerte celular, pero hoy en día existe suficiente evidencia de que la ejecución de la muerte celular necrótica puede ser finamente regulado por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos [265, 266].

La autofagia deriva del griego comer (fagia) uno mismo (auto), o sea auto digestión. Este es un proceso altamente conservado en la evolución, ocurre virtualmente en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos, como parte de su desarrollo normal [267, 268]. En la autofagia ocurre una secuencia de cambios morfológicos en un proceso altamente regulado. La vía autofágica comienza con el secuestro de material citoplasmático formando vesículas de doble membrana conocidos como los autofagosomas, este proceso está bajo el control de las GTPasas y quinasas de fosfatidilinositol; los autofagosomas se fusionan con los lisosomas, formando los autofagolisosomas, en un proceso en función de los microtúbulos para su degradación [269]. *In vivo*,

las células sometidas a la autofagia pueden ser fagocitadas por las células vecinas. Morfológicamente se produce en ausencia de condensación de la cromatina, pero está acompañado por vacuolización autofágica masiva del citoplasma. En contraste con las células apoptóticas, las células que mueren con una morfología autofágica tienen poca o ninguna asociación con los fagocitos [270].

Durante las últimas dos décadas, decenas de neologismos se han introducido para definir nuevas modalidades de muerte celular putativa, pero estas expresiones se deben usar con precaución, ya que sólo unos pocos de ellos reflejan realmente el descubrimiento de las modalidades de muerte celular que son bioquímicamente y morfológicamente distintas de la apoptosis y la necrosis. Así, aunque los términos incluidos: catastrofe mitótica, onocosis, anoikis, entosis, piroptosis, partanatos o autoschizis están siendo utilizados por la comunidad científica, lo más a menudo se refieren a los modos de muerte celular que se ejecutan (al menos en parte) por la maquinaria molecular de la apoptosis o necrosis, y que, como consecuencia, se manifiestan algunos de los correspondientes rasgos bioquímicos y morfológicos [265].

1.3.3 Métodos para medir apoptosis

La apoptosis no se puede determinar con precisión mediante el control de un solo parámetro individual, debido a que ciertos eventos asociados con la apoptosis también se producen durante otros tipos de muertes no apoptóticas. Por otra parte, varios procesos apoptóticos se manifiestan en ámbitos de muerte como

efectos fisiológicos no letales. Los ensayos de apoptosis en su mayor parte se subdividen en dos categorías: ensayos que detectan los eventos que ocurren en la mayoría (si no todos) de los casos de muerte celular por apoptosis y ensayos que miden los procesos de la vía específica, y en cuyo caso depende de la iniciación de la apoptosis, el estímulo y del contexto celular preciso de la señalización letal. Las técnicas adecuadas para la detección de la apoptosis en la mayoría de los casos incluyen caracterización morfológica, métodos que cuantifican picnosis, condensación nuclear y la generación de cuerpos apoptóticos, así como ensayos que detectan la fragmentación del ADN, tales como etiquetado del *desoxinucleotidil terminal de dUTP nick-end transferasa mediada* (TUNEL) [271]. La activación de caspasas fue considerado un marcador universal de la apoptosis [272] antes del descubrimiento de casos de muerte celular independiente de caspasas que se manifiestan con morfología apoptótica [273]. Por otra parte, se ha encontrado recientemente que las caspasas iniciadoras y ejecutoras-tales como la caspasa 8 y caspasa 3, respectivamente - ejercen funciones no letales como moléculas de señalización intracelular [274] (por ejemplo, en la inflamación o en la diferenciación de precursores hematopoyéticos). Sin embargo, la evaluación de la actividad caspasa sigue siendo una parte importante de la detección de la apoptosis. La activación de caspasas durante la apoptosis es transitoria, y el momento de la prueba debe ser cuidadosamente optimizado antes de su aplicación [272].

La exposición de fosfatidilserina en la parte exterior de la membrana plasmática constituye un evento temprano en la apoptosis. Ecto-fosfatidilserina puede ser detectada fácilmente debido a su unión específica con Annexina V, la cual puede

ser marcada de diversas formas para su detección [275]. Cuando se permeabiliza la membrana plasmática, la Anexina V también se une a la fosfatidilserina intracelular, lo que implica que esta tinción es incompatible con la muestra de permeabilización, y que las células necróticas, con independencia de su origen, responden positivamente para Anexina V [258]. Para distinguir las células apoptóticas (que son anexina V-positiva pero con membranas plasmáticas intactas) de células no apoptóticas, la tinción con anexina V normalmente se combina con colorantes impermeables a las células, tales como yoduro de propidio [276]. Algunos tipos de células no exponen fosfatidilserina durante la apoptosis, debido a una aberración que se ha relacionado con defectos con la enzima escramblasa, la responsable de la exposición.

El potencial de la membrana mitocondrial (MMP, por sus siglas en inglés) puede ser iniciado por los miembros de la familia BCL-2 pro-apoptóticos reguladores de la apoptosis de proteínas en la membrana mitocondrial externa, o por el llamado poro de transición de permeabilidad mitocondrial en el interior de la membrana mitocondrial [276]. El MMP es ampliamente considerado como el punto de no retorno en la cascada bioquímica que conduce a la apoptosis intrínseca y, a menudo también contribuye a la apoptosis extrínseca [277]. Las consecuencias más destacadas de MMP incluyen la disipación del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), detención de la síntesis de ATP mitocondrial, la sobreproducción de ROS y la liberación citosólica de proteínas citotóxicas que normalmente son retenidas dentro del espacio mitocondrial intermembranal [278]. Cualquiera de estos eventos se pueden detectar para evaluar la participación de las mitocondrias en la muerte celular, sin embargo la producción de ROS, no sólo

se deriva de células en apoptosis sino también puede constituir un suceso de señalización temprana en algunos casos de necrosis y autofagia, y puede contribuir a la ejecución de necroptosis [279]. La translocación citoplasmática intermembranal de proteínas espaciales, tales como el citocromo c (CYC) y el factor inductor de apoptosis (AIF) son también detectables.

1.3.4 Ensayos de citostaticidad

La citostaticidad, es el acto de detener a la célula en una fase del ciclo celular. El ciclo celular se define como una serie ordenada de acontecimientos macromoduladores que conducen a la replicación y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la célula madre [17,18]. El ciclo celular consta en cuatro fases principales: G1, S (Síntesis de ADN), G2 (Intervalo 2), llamadas conjuntamente interfase; y la M (Mitosis) [280]. Cada fase tiene una función específica para garantizar la correcta división celular; además, para lograr el orden correcto de los eventos que constituyen el ciclo existen una serie de puntos de control que aseguran que la célula no entre en la siguiente fase del ciclo sin haber completado adecuadamente la fase anterior [19]. La principal responsabilidad de los puntos de control es asegurar la correcta replicación del ADN, así como proteger, conservar y mantener la fidelidad del genoma de las células de la progenie [103]. Estas vías de regulación se denominan comúnmente puntos de control del ciclo celular: en la fase G1 donde impiden la replicación del ADN dañado mediante el bloqueo de la entrada en la fase S; si el daño ocurre durante la fase S o ha evadido el punto de control G1, el

puesto de control dentro de la fase S se activa bloqueando la replicación, el siguiente punto de control está en la fase G2 donde se evita que las células entren en mitosis y finalmente un punto de control en la fase de mitosis donde se evalúa el tamaño de la célula, las señales de crecimiento extracelulares, y la integridad del DNA [17]. Las divisiones celulares y su regulación desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer, es por esto que se mide la duración de las fases individuales del ciclo celular bajo diferentes condiciones de tratamiento lo que puede mejorar la comprensión de los mecanismos biológicos de enfermedades oncológicas y la eficacia de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Durante las últimas décadas se han descrito varios métodos para analizar la progresión del ciclo celular; entre los métodos para establecer si una sustancia tiene efecto citostático sobre las células se encuentran la medición de las ciclinas (ciclina D, ciclina E, ciclina A, o ciclina B1) [19], el contenido celular de ADN o estimar su tasa de proliferación midiendo la progresión de las células a través de la fase M del ciclo (después de la tinción celular, ya sea con yoduro de propidio (IP) o 4',6'diamidino-2-fenilindol (DAPI)). El análisis de los histogramas de frecuencia de contenido de ADN celular, demuestra la distribución de células en tres principales fases del ciclo (G1, S y G2/M), además hace posible la detección de células apoptóticas por el contenido de ADN fraccionado [281]. Estimaciones del recuento mitótico se utilizan ampliamente como una simple medida de la proliferación celular. La progresión de las células a través de la fase M del ciclo celular sirve para identificar compuestos que inhiben o inducen la progresión mitótica [282].

1.3.5 Relación entre la familia de p53, citostaticidad y muerte celular

Una gran cantidad de diferentes tensiones puede activar p53 en el contexto de la iniciación del tumor o su progresión, incluyendo la privación de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo, las señales hiperproliferativas. Dichas tensiones también podrían promover daño crónico al ADN o estrés oxidativo, desgaste de telómeros y el agotamiento de ribonucleótidos. La activación de p53 por estas señales pueden promover diversas respuestas como detención del ciclo celular, senescencia, apoptosis y reparación del ADN, lo que podría ocurrir a través de vías distintas a las utilizadas en el daño agudo al ADN (Figura 7) [283]. p53 puede modular varios procesos celulares adicionales que son relevantes para suprimir el desarrollo de tumor, incluyendo oposición a la reprogramación metabólica oncogénica y la limitación de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la activación de la autofagia, la promoción de comunicación en el microambiente tumoral. p53 induce una detención del ciclo celular G1 transitoria en respuesta a las señales de daños en el ADN, permitiendo a las células reparar genomas antes de proceder a través del ciclo celular, y limitando así la propagación de mutaciones potencialmente oncogénicas. p53 desencadena la detención en G1 en respuesta al daño del ADN transactivando Cdkn1a, como se muestra por la respuesta de detención defectuosa de células que se derivan de ratones Cdkn1a $-/-$ tras la exposición a daño en el DNA. Sorprendentemente, sin embargo, se encontró que los ratones deficientes en p21, no del todo o sólo ligeramente propensos a desarrollar tumores espontáneos, potencialmente debido

a que otros genes diana detención del ciclo celular p53 permanecen imperturbables [283].

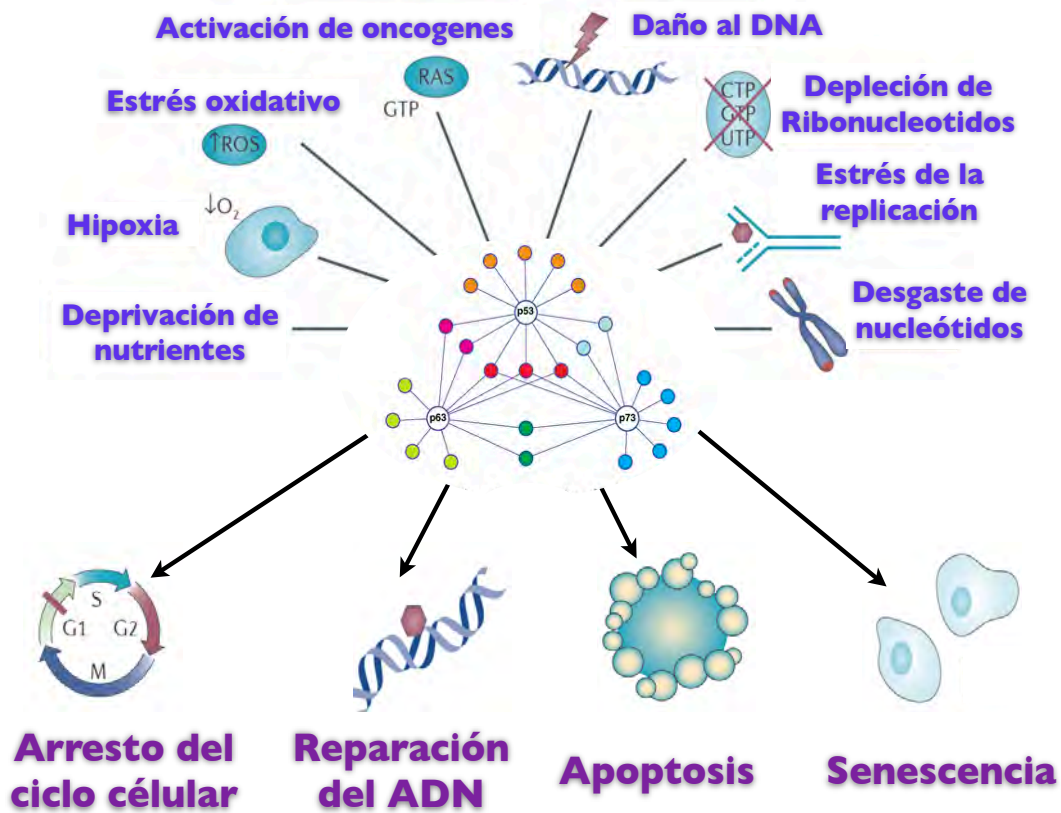


Figura 7. Familia de p53 y sus funciones. Adaptado de Biegging et.al. 2014 [283].

Dos proteínas relacionadas con p53, son p63 y p73, identificadas como miembros de la familia de genes *p53*. Múltiples isoformas de p73 se han encontrado, incluyendo variantes ΔN en la que el N-terminal se trunca. p63 se expresa como tres principales formas, p63 α , p63 β y p63 γ , cada uno de los cuales difieren en su C-terminales [284]. Las tres formas pueden ser alternativamente transactivadas a partir de un promotor críptico situado en el intrón 3, produciendo $\Delta Np63\alpha$, $\Delta Np63\beta$

y Δ Np63Y. El alto grado de similitud de p73 y p63 con regiones conservadas de p53 sugiere que estas proteínas desempeñan un papel importante y potencialmente redundante en la regulación de la detención del ciclo celular y la apoptosis (Figura 7) [285, 286]. Tanto TAp63 y TAp73 pueden inducir la detención en G1 del ciclo celular a través de regulación transcripcional sobre p21 y p57/Kip2. La transcripción de estos promotores es reprimida por las isoformas Δ N que promueven la progresión del ciclo celular. TAp73 también actúa como un represor de fase G2/M con reguladores tales como CDC25B, Cdc25C, ciclina B1, ciclina B2, CDC 2 y la topoisomerasa II α , curiosamente Δ Np63 tiene una actividad represiva similar en algunos de estos promotores (Ciclina B2, cdc2 y Topo II α) [287]. p73 contribuye con FLASH para la transcripción de genes de histonas y de sus resultados de pérdida de un bloque en el punto de control G2/M. Más interesante TAp73 interactúa con las proteínas de punto de control de montaje del huso (Bub1, Bub3 y BubR1) y coopera en su actividad. Por lo tanto, la expresión de p73 alterada resulta en la inestabilidad genómica. Por ello, el papel de las distintas isoformas en la regulación del ciclo celular es extremadamente complejo y es más complicado por una serie de modificaciones post-transcripcionales que estas proteínas se someten en respuesta a diferentes estímulos [288]. TAp63 y TAp73 inducen la muerte celular a través de diferentes mecanismos, controlan la vía mitocondrial a través de la regulación de pro-apoptótica Bax, miembro de la familia Bcl-2, y promueve su translocación a la mitocondria mediante el control de la expresión de la única proteína BH3 PUMA. TAp73 puede inducir la muerte celular también a través de la vía de estrés ER por sobre regulación de Scotin [112]. Tanto TAp63 y TAp73 pueden modular la vía del receptor de muerte. TAp63

y TAp73 inducen la expresión de CD95, mientras que TAp63 se ha demostrado que induce también la expresión de Trail-R1, TRAIL-R2 y TNF-R1. La caspasa 8 y la expresión de FLIP son regulados por TAp63 que por lo tanto ejerce un control adicional sobre la vía apoptótica extrínseca [289]. $\Delta Np73$ carecen del dominio TA e inicialmente su función se ha relacionado con la capacidad de actuar como negativos dominantes de la isoformas TA, así como p53. De hecho $\Delta Np73$ puede reprimir la actividad transcripcinal de TAp73 a través de la formación de oligómeros inactivos, así como la competencia por la unión al ADN mientras que antagoniza p53 sólo a través de este último mecanismo. Al interferir con p53 y TAp73 las isoformas ΔN inhiben la apoptosis y promueven la progresión del ciclo celular [290].

1.4 Genotoxicidad de los fármacos antineoplásicos

Una gran parte de los fármacos antineoplásicos utilizados actualmente en la clínica interactúan directamente con el DNA y/o en la síntesis y replicación del mismo, de tal manera que producen daño genotóxico, desafortunadamente este efecto es similar tanto en las células del tumor como en células normales; es por esta razón que algunos antineoplásicos como: el mefalan, la ciclofosfamida y algunas terapias combinadas (etopósido más cisplatino junto con bleomicina) han sido clasificados como carcinogénicos según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (*IARC*, por sus siglas en inglés [291]. Estudios retrospectivos, han demostrado que en los pacientes sobrevivientes de cáncer infantil, el riesgo relativo de presentar un nuevo cáncer con respecto a la población es de 3 a 10 veces mayor, debido al daño genotóxico producido por la terapia recibida [292,293]. Otros efectos adversos en los pacientes tratados con antineoplásicos son la infertilidad y daños cromosómicos en la siguiente generación debido a que los fármacos también interfieren con la gametogénesis tanto en los espermatozoides como en los ovocitos [294]. Además, como respuesta al daño causado por la quimioterapia las células tumorales pueden aumentar la resistencia a uno o varios fármacos, incrementado la expresión de transportadores ABC, de enzimas de detoxificación como el p450, así como la reducción de la apoptosis [295]. De allí que existe la necesidad de evaluar además de la capacidad citotóxica de los antineoplásicos su interacción con el ADN. Existe una gran variedad de ensayos de genotoxicidad que miden la interacción de las sustancias con el ADN o los mecanismos relacionados con la división del material

genético tales como la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y el ensayo del cometa.

1.4.1 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)

Los micronúcleos (MN) son pequeñas formaciones nucleares que se presentan además de los dos núcleos típicos que se forman en la telofase y se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros que han quedado rezagados en la anafase durante la división nuclear [296]. Fragmentos de cromosomas acéntricos se originan de roturas de doble cadena de ADN que conducen a la formación de un fragmento de cromosoma acéntrico que se produce a menudo en conjunción con la formación de un cromosoma dicéntrico [297]. Los MN también pueden surgir cuando existen rupturas en más de un sitio cuando los cromosomas dicéntricos son acercados a los polos opuestos de una célula durante la anafase. La segregación deficiente de cromosomas enteros se puede inducir si el agente químico causa un mal funcionamiento del centrómero y/o del cinetocoro o interrumpe el huso mitótico o centrosoma [298]. El mecanismo directo de la inducción de daño en el ADN ha sido demostrado para un número limitado de productos químicos genotóxicos mientras que para la mayoría ni el mecanismo directo ni el indirecto de inducción de daño en el ADN se ha establecido. Los mecanismos conocidos de cómo los químicos pueden inducir la formación de MN se presentan esquemáticamente en la Figura 8, aunque existen probablemente varias otras de las cuales faltan estudios consistentes.

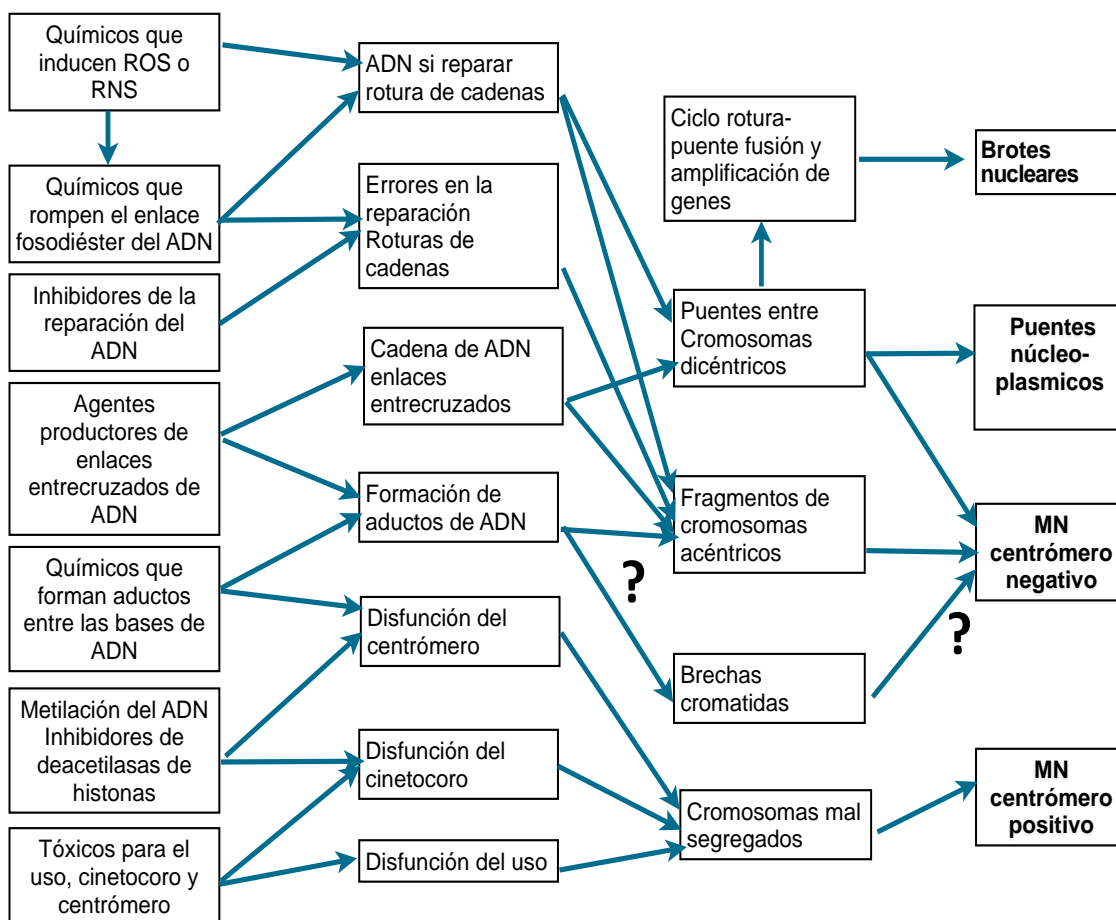


Figura 8. Inducción de Micronúcleos. Los mecanismos conocidos por el cual las sustancias químicas genotóxicas pueden inducir micronúcleos, brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos en linfocitos con bloqueo de la citocinesis. MN, micronúcleos; ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. El signo de interrogación (?) indica un conocimiento insuficiente sobre el mecanismo y / o cierta incertidumbre. Adaptado de Krisch-Volders, 2014 [299].

Los MN pueden producirse debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo [300].

El ensayo CBMN fue validado a nivel mundial con el *HUMAN Micronucleus Project* (*HUMN*, por sus siglas en inglés), realizado en más de 30 laboratorios

alrededor del mundo además de ser considerado como un biomarcador efectivo de daño en el ADN [301]. El ensayo de MN es uno de los pocos ensayos disponibles para analizar alteraciones citogenéticas tempranas en tejidos epiteliales, antes de que ocurran los cambios malignos [302]. El ensayo también provee información valiosa para complementar los resultados de otros ensayos *in vitro* de genotoxicidad [303].

1.4.2 Ensayo de electroforesis de célula única (Ensayo del Cometa)

El ensayo de electroforesis en gel de célula única o ensayo cometa es ampliamente utilizado en estudios de biomonitoreo humano para medir el daño del ADN como marcador de exposición a agentes genotóxicos o para investigar efectos protectores sobre el ADN. La versión del cometa introducida por Singh, utiliza electroforesis alcalina ($\text{pH} > 13$) para detectar el daño al ADN inducido por agentes físicos y químicos, es la más utilizada hoy en día [304].

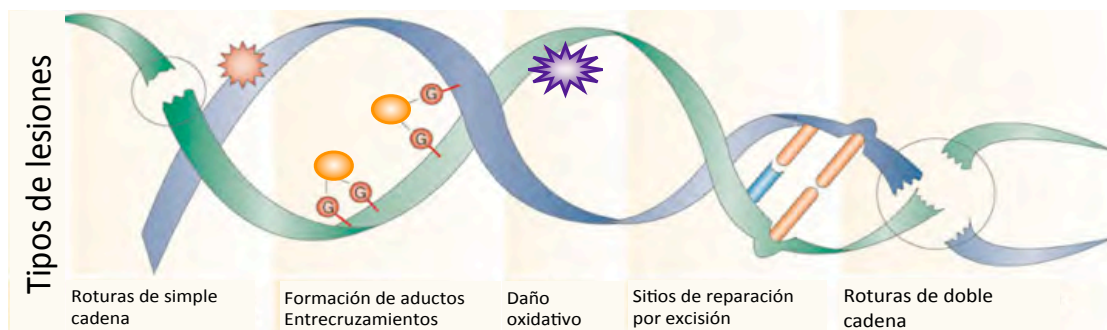


Figura 9. Tipos de daños medidos mediante la versión alcalina del ensayo del cometa. Adaptado de Krisch-Volders, 2014 [299].

En la Figura 9 se esquematiza los tipos de daño al ADN que pueden ser medidos con la versión alcalina, como por ejemplo roturas de simple cadena del ADN,

sitios alcalí lábiles (apurínicos / apirimidínicos), enlaces cruzados, y los sitios de reparación del ADN en las células individuales [305][306]. El ensayo cometa ha sido usado en biomonitorio humano ambiental y ocupacional, en estudios sobre genotoxicidad por exposición a agentes potencialmente mutagénicos, a nivel clínico (en pacientes con cataratas, cánceres y diabetes), efecto del estilo de vida, en la interacción entre dieta y consumo de antioxidantes sobre la carcinogénesis, análisis de alimentos irradiados en ecotoxicología, biología de la radiación, genotoxicidad ambiental y toxicología genética [305,307–313].

Además para la determinación de la capacidad genotóxica de productos obtenidos a partir de especies vegetales [314-315].

Dado a lo mencionado anteriormente y la diversidad de especies biológicas de Ecuador en el presente trabajo se enfocó a la selección y evaluación de especies de plantas medicinales de la zona Sur del Ecuador, con probable potencial antitumoral, enfocados desde su efecto citotóxico y/o citostático, la identificación y aislamiento de metabolitos secundarios y esclarecer los mecanismos por lo cuales inducen el efecto de muerte celular pero además establecer si interaccionan con el DNA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBEJTIVO GENERAL:

Identificar compuestos obtenidos de especies de flora del Sur de Ecuador, utilizadas en la medicina tradicional que inhiban el crecimiento celular tumoral y que induzcan apoptosis sin ser genotóxicos.

2.2 OBEJTIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de extractos orgánicos obtenidos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional en el sur del Ecuador.
- Aislar compuestos mediante el fraccionamiento de los extractos y determinar la actividad apoptótica.
- Identificar y caracterizar químicamente los compuestos activos
- Determinar y seleccionar los compuestos no genotóxicos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

El presente proyecto se desarrolló en 6 componentes: (1) La selección de especies de Ecuador con potencial antitumoral, (2) la obtención de extractos (3) el tamizaje primario: inhibición del crecimiento tumoral, (4) aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios, (5) la caracterización del efecto tumoral y (6) el estudio de la genotoxicidad en linfocitos humanos. La Figura 10, muestra la estrategia experimental.

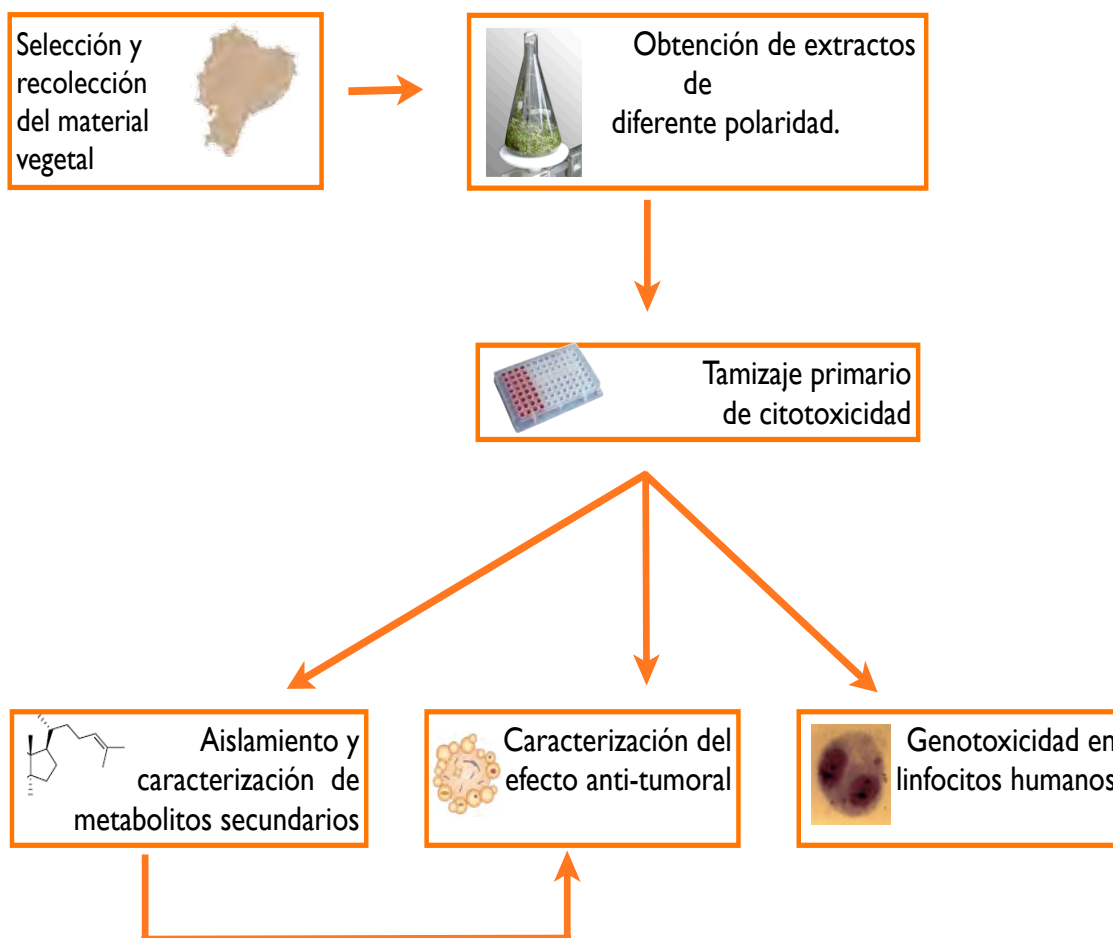


Figura 10. Estrategia experimental de trabajo.

3.1 Selección de especies vegetales

Para la selección de la especie vegetal se utilizaron 3 criterios: (1) el etnomédico, (2) la distribución espacial y (3) el quimiotaxonómico. De acuerdo con la información etnomédica proporcionada por los jambiyachaks (médicos tradicionales en lengua quichua) de la comunidad de Saraguro e integrantes de la comunidad Shuar (Sur de Ecuador); 534 especies son empleadas en medicina tradicional, de las cuales 25 son usadas en el tratamiento del cáncer o enfermedades relacionadas. De estas especies se seleccionaron aquellas que fuesen nativas o endémicas de la región, así como de las cuales existan reportes en la literatura sobre la actividad citotóxica de los extractos o de alguno de los compuestos que haya sido aislado del género en líneas tumorales humanas. De acuerdo con la selección se trabajó con *Oreopanax andreanus* (Araliaceae), *Annona montana* (Annonaceae), *Clusia latipes* (Clusiaceae) y *Gynoxys verrucosa* (Asteraceae).

3.1.1 Recolección de las muestras:

Hojas y frutos de planta adultas fue recolectado en diversas localidades de la Provincia de Loja-Ecuador (Tabla 2). Un ejemplar de cada especie fue depositado en el Herbario del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. Las especies fueron identificadas por el PhD. Vladimir Morocho. Tanto las hojas como el fruto de las especies en estudio fue sometido a un proceso de secado a 30 °C durante siete días en un secador de bandejas con flujo de aire.

Una vez seco, se redujo a partículas pequeñas mediante trituración manual hasta un tamaño adecuado.

Tabla 2. Especies vegetales utilizadas y lugar de recolección

Familia	Especie	Parte recolectada	Lugar de recolección	Fecha de recolección
Araliaceae	<i>Oreopanax andreanus</i>	hojas	Villonaco, Catamayo, Loja Ecuador	Julio 2008
Annonaceae	<i>Annona montana</i>	fruto	Guayquichuma, Loja-Ecuador	Enero 2008
Clusiaceae	<i>Clusia latipes</i>	hojas	Gonzanama-Quilanga, Loja - Ecuador	Septiembre 2009
Asteraceae	<i>Gynoxys verrucosa</i>	hojas	Yangana, Loja-Ecuador	Febrero 2007

3.1.2 Preparación de los extractos.

El material seco y molido fue sometido a maceración a temperatura ambiente, secuencialmente por tres ocasiones con hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt), y metanol (MetOH) durante tres días con cada disolvente. Los diferentes extractos fueron concentrados a presión reducida en el rotevaporador modelo R210 (Buchi). Los extractos obtenidos fueron almacenados a 8°C y protegidos de la luz hasta su utilización.

3.2 Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

3.2.1 Procedimientos químicos generales

Para los procedimientos de extracción se utilizaron disolventes grado industrial, destilados en el laboratorio. Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) y en capa preparativa (CCP) se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, empleando placas de vidrio de 20 x 20 cm² recubiertas con gel de sílice F254 de 0.2 y 2 mm de espesor respectivamente (Merck). Los procedimientos de cromatografía en columna abierta se efectuaron en columnas de vidrio de diferentes capacidades empleando gel de sílice F254 como adsorbentes. El revelado se realizó con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (350 nm) y con una solución de sulfato cérico.

Los puntos de fusión de cada compuesto en estudio se determinaron en un equipo Fisher Johns y no fueron corregidos. Los espectros de Infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se adquirieron a 200 ó 300 MHz y 50 ó 75.5 MHz, respectivamente, en los equipos Varian-Gemini 200, Unity 300, Eclipse 300, Jeol o Bruker-Avance 300. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) se informaron en Hz. El tetrametilsilicio (TMS) se empleó como referencia interna. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Jeol AH505HR y fueron realizados en el Instituto de Química de la UNAM.

3.2.2 Caracterización e identificación de metabolitos secundarios.

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron a 400 MHz y 100 MHz respectivamente, en un equipo Varian 400 MHz-Premium Schelded del Instituto de Química de la UNAM), usando tetrametilsilano como referencia interna. Se utilizó cloroformo deuterado como disolvente, los desplazamientos químicos fueron expresados en partes por millón (ppm), y las constantes de acoplamiento (J) en (Hz). Los espectros de masas fueron determinados en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) con una columna cromatográfica BSNS (Instituto de Química de la UNAM).

3.3 Tamizaje primario: Actividad inhibitoria del crecimiento celular

3.3.1 Disolución de los extractos

Los extractos fueron disueltos en DMSO al 100% y posteriormente se diluyeron en medio de cultivo hasta obtener las disoluciones adecuadas (10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para el estudio, de tal manera que el DMSO no sobrepase el 1% de concentración final.

3.3.2 Líneas celulares:

Para la evaluación se usaron líneas celulares de cáncer humano: PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), K562 (leucemia), U251 (SNC), HCT-15 (cáncer de colon) y D-384 (astrocitoma cerebral).

Cada línea celular fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 IU/mL), estreptomina

(100 µg/mL). Los cultivos se incubaron a 37°C, humedad del 95%, en una atmósfera con un 5% de CO₂ (LABCONCO).

Posterior al cultivo, las células adherentes fueron separadas por procedimientos convencionales con una solución de tripsina para obtener suspensiones celulares. La cantidad de células viables de cada línea celular se determinó empleando el método de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro.

3.4 Determinación de la inhibición de la proliferación

En la primera fase de evaluación, los extractos fueron probados a 50 µg/mL mediante el ensayo MTT o MTS. Para continuar con el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios, la caracterización de la actividad anti-tumoral y los ensayos de genotoxicidad, se establecieron criterios de selección de los extractos y únicamente se continuó trabajando con aquellos que: (1) El porcentaje de inhibición fue mayor o igual al 30% en más de un tipo de células y/o (2) si la inhibición fuese del 100% en un sola línea celular, de acuerdo con los criterios establecidos por INC para considerar un extracto es activo [316].

3.4.1 Ensayo MTT y MTS

En una caja de 96 pozos se sembraron 3000 células en 100 µL de medio de cultivo por pozo y se incubaron por 24 h; las células se expusieron a los extractos (50 µg/mL) durante 48 h. Se utilizaron como control negativo y control positivo DMSO al 0.5% y Doxorubicina 2 µM respectivamente; en todos los casos se agregó medio de cultivo para completar un volumen final de 200 µL en cada pozo. Transcurrido el tiempo de exposición se añadieron 20 µL de reactivo de MTT o

MTS siguiendo las indicaciones del kit (cell titer 96°, Aqueos one solution reagent, GIBCO); se incubaron por 2 h. En el caso del MTT los cristales fueron disueltos con DMSO y se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro (Sunrise) a una absorbancia de 490 nM. Cada experimento se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes. Para el análisis, los valores obtenidos de las células tratadas con DMSO se consideraron como el 100%.

3.5 Caracterización del efecto antitumoral

Para la caracterización del efecto tumoral se seleccionó el metabolito secundario con mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral y obtenido en mayor proporción, así como la línea celular más sensible. En este caso la Dehidroleucodina y las células D-384 (astrocitoma cerebral).

3.5.1 Observación de cambios morfológicos celulares.

Las células D-384 se cultivaron a una densidad de 1×10^6 células /mL en placas de cultivo de 60 mm. Después de 16 h de incubación, las células fueron tratadas con, o sin, diversas dosis de DhL durante 6 h, 16 h y 32 h. Después del tratamiento, las células se visualizaron bajo un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon) para observar los cambios morfológicos celulares por tratamiento, y se tomaron fotografías. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5.2 Índice mitótico e Índice de replicación

Para los índices mitótico y de replicación se sincronizaron las células D-384, se sembraron a $4,8 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 6 pocillos con medio RPMI

(Gibco/Life Technologies) libre de SFB durante 16 h, esto con el fin de privar a las células de este nutriente y obligarles a entrar en un estado de reposo. Las células fueron tratadas con DhL y con BrdU (3.24 μ M), al medio también se adicionó SFB al 10%; después de 32 h de cultivo se añadió colcemida (0.13 g/mL) para la inhibición de la citocinesis. Finalmente, después de 24 h, las células cultivadas se incubaron en solución hipotónica de KCl (0.075 M) durante 30 min. a 37°C y 5% CO₂. Después de la fijación (metanol/ácido acético 3:1) las células se colocaron en portaobjetos y se tiñeron de acuerdo con el método de fluorescencia más Giemsa 0,8% para diferenciar las cromátidas hermanas. Se realizó un análisis microscópico para determinar el índice mitótico (IM) anotando el número de metafases presentes en 2000 células. La proporción de la primera (M1), segunda (M2) y tercera o más (M3) divisiones mitóticas en 200 metafases se evaluaron para determinar el índice de replicación (IR) de acuerdo con la fórmula $RI = (M1 + 2M2 + 3M3) / \text{metafases totales analizadas}$.

3.5.3 Análisis del ciclo celular.

La distribución del ciclo celular se evaluó mediante la tinción con yoduro de propidio (IP). Las células D-384 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm (1 $\times 10^6$ células). Luego de 24 h, las células fueron tratadas con DMSO 0,1% v/v y DhL (5-10 μ M) durante 16 h. Las células se recogieron, se lavaron con PBS, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 μ L de PBS, se fijaron con etanol absoluto y se almacenaron a -20°C durante 24 h. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS, y los sedimentos celulares se incubaron con IP 50 μ g/mL, de citrato de sodio 0.1%, Triton-X-100 0,1% y de RNasa A 100 μ g/mL, durante 30 min

en la oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación se analizó el porcentaje de células en las fases de G1, S, y G2/M del ciclo celular utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II. Los datos se obtuvieron y analizaron utilizando el software DIVA (Becton Dickinson). La integración del área bajo la curva para cada una de las fases del histograma se realizó con el software ModFit LT.

3.5.4 Ensayo clonogénico de las células *in vitro*.

Las células se sembraron en placas Petri de 100 mm en el de baja densidad (1×10^4 por placa), se dejaron adherir durante 24 h en medio con SFB. Se añadieron concentraciones crecientes de DhL; después de 16 h las células se trataron con tripsina, se resuspendieron a una concentración de 100 células por placa y fueron sembradas. Después de 15 días de crecimiento, se determinó la formación de colonias macroscópicas. Las colonias se fijaron con una mezcla 3: 1 de metanol/ácido acético y se tiñeron con cristal violeta. Sólo las colonias que constan de más de 50 células se contabilizaron. Los ensayos fueron realizados por duplicado en tres experimentos independientes.

3.5.5 Ensayo de apoptosis (Anexina V-FITC/PI)

Se realizó el análisis de citometría de flujo para identificar y cuantificar las células apoptóticas usando un kit de detección de apoptosis, PI Anexina V-FITC/PI (BDBioscience). Las células D-384 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Después del tratamiento con diversas dosis de DhL durante 16 h, las células tanto adherentes y flotantes se cosecharon y se

tiñeron con Anexina V-FITC/IP de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo BD FACSCanto™ II.

3.5.6 Análisis de transferencia por Westernblot.

La extracción de proteína se realizó con un amortiguador de lisis Ripa en presencia de inhibidores de proteasas (N-P40 1 %, desoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.1 %, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, Aprotinina 72.6 ng/ml, PMSF 319 mg/ml, ortovanadato de sodio 3.2 mM y NaF 30 mM, disuelto en PBS) a 4°C. El homogenizado se centrifugó a 14 000 rpm (Eppendorf) por 15 minutos a 4 °C. La porción del sobrenadante se recuperó y la concentración de proteína total se cuantificó por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad), utilizando albúmina sérica de bovino (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia. Veinte µg de proteína total se separaron en un gel del 12% de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (IPVH00010, Immobilon-P, 0.45 µm, Millipore). Los anticuerpos policlonales de conejo contra BAX, caspasa (CASP-3), CDKN1A (p21), TP53 total, TP53 fosforilado (TP53-S46), TP73 total, TP73 fosforilado (TP73-Y99) y γ H2A.X (p-S139-histona) se obtuvieron de Santa Cruz Biotecnología y se utilizan en una dilución recomendada (1:200), mientras que el anticuerpo monoclonal de ratón contra la alfa-tubulina (EMD-Millipore) o beta-actina se utilizó a una dilución de 1: 10.000. Las membranas fueron posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón 1:5000 conjugado con peroxidasa(EMD-Millipore). Las bandas inmunorreactivas se

visualizaron utilizando un kit de quimio-luminiscencia con el SuperSignal West Pico Substrato quimioluminiscente (Pierce-Thermo Scientific).

3.6 Evaluación de la actividad genotóxica en linfocitos humanos

La genotoxicidad de extractos y M.S. fue evaluada en el modelo de linfocitos normales humanos aislados de sangre periférica y analizada por Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) y por el ensayo del cometa. De acuerdo con los resultados obtenidos del tamizaje primario se seleccionó algunos extractos para el uso del ensayo cometa y del ensayo de micronúcleos.

3.6.1 Ensayo del cometa

Para el ensayo del cometa, se utilizó sangre completa obtenida de 3 individuos varones sanos de 19 a 25 años de edad. Se sembraron 71.4 μ L de sangre heparinizada en tubos eppendorf conteniendo 928.6 μ l de medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado al 1% con antibiótico/antimicótico (GIBCO), L-glutamina (GIBCO) y aminoácidos no esenciales (GIBCO). Se aplicó el tratamiento correspondiente por duplicado. Se probaron tres distintas dosis de extractos y de la Dehidroleucodina, de acuerdo con los datos obtenidos de la citotoxicidad en células tumorales. Se usó etil metanosulfonato (EMS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como controles positivos y DMSO al 0.5% como control negativo. Se incubó a una temperatura de 37°C, atmósfera húmeda y 5% de CO_2 durante 3 h. Se tomó una alícuota de 50 μ L de cada muestra para determinar el porcentaje de células viables mediante la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína–bromuro de etidio (FDA/EtBr), contando un total de 200 células (vivas

de color verde y muertas de color rojo). Para el ensayo del cometa las células se centrifugaron a 800 r.p.m por 10 min. y se resuspendieron en 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1%; 75 μ L de esta mezcla se colocaron por duplicado en laminillas previamente tratadas con agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1 %. Inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos y se llevaron a refrigeración durante 5 min. Se les aplicó una segunda capa de agarosa LMP, repitiéndose los pasos mencionados. Posteriormente, las laminillas se colocaron en una solución de lisis (DMSO 10 %, de tritón X-100 1 %, NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM a pH 10), por un tiempo mínimo de 1 h y máximo de 15 días. Antes de realizar la corrida electroforética, con el fin de permitir el desenrollamiento del ADN, las laminillas se dejaron por 1 h, en el amortiguador de electroforesis a pH 13 (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM) hasta cubrir las completamente. Transcurrido este tiempo se realizó la corrida electroforética en forma horizontal, las condiciones usadas fueron: 25 V, 300 mA durante 20 min. Al término de la electroforesis, las laminillas se lavaron con amortiguador de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5) y se deshidrataron con metanol absoluto para su posterior análisis. Las laminillas fueron hidratadas en agua desionizada fría y teñidas con 60 μ L de bromuro de etidio 1.5 μ g/mL. La migración del ADN se evaluó contabilizando 100 cometas por cada laminilla, midiendo la longitud de su cola en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo 40x. Cada experimento se realizó por duplicado en tres experimentos diferentes, por cada donante. Los datos obtenidos fueron analizados por medio del programa GraphPad Prism 5.0, utilizando la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, dada la distribución no normal de los datos.

3.6.2 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN).

Para ello, la sangre periférica heparinizada (0.5 mL) se cultivó durante 72 h a 37°C en 6.3 mL de RPMI-1640 suplementado con L-glutamina 1% (Sigma), aminoácidos no esenciales 1% (Sigma), y fitohemaglutinina 0.2 mL (Sigma-Aldrich). Se probaron 3 diferentes concentraciones de Dehidroleucodina (5, 15 y 25 µM), DMSO y Mitomicina C (1 µM) (Sigma) se utilizaron como disolvente y control positivo, respectivamente. Se retiró una alícuota para el ensayo de viabilidad. La prueba de CBMN se realizó de acuerdo con las modificaciones de Fenech. Para el conteo de micronúcleos, de cada cultivo se evaluaron 1.000 células binucleadas. La cinética de proliferación celular se analizó mediante la determinación de la frecuencia de células mononucleadas (Mono), binucleadas (Bi) y polinucleadas (poli), que corresponde a 0, 1, y 2 o más en divisiones celulares *in vitro*, respectivamente. La actividad citostática se determinó mediante el cálculo del índice de proliferación nuclear usando la siguiente ecuación: Índice de Proliferación Nuclear (IPN) = [#Mono + 2 # 3 # Bi + Poli]/200.

4 RESULTADOS

Las especies seleccionadas para el presente estudio fueron: *Oreopanax andreanus*, *Annona montana*, *Clusia latipes* y *Gynoxys verrucosa*. A continuación se detallaran los resultados obtenidos para cada especie.

4.1 *Oreopanax andreanus*

El género *Oreopanax* consta de 80 especies distribuidas en América tropical. Existe un solo reporte detallado en la literatura sobre su composición fitoquímica [317], en el cual informan el aislamiento de 17 triterpenos de tipo lupano y oleanano. En el presente estudio de 570 g de hojas secas se obtuvo el extracto de diclorometano/metanol, y al cual fue evaluada su actividad inhibitoria del crecimiento tumoral (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas a 50 ug/ml de extracto de hojas de *Oreopanax andreauns*.

Extracto (50 µg/mL)	% de inhibición				
	SNC	Líneas de cáncer humano			Colon
		Leucemia	Mama	Prostata	
Diclorometano/metanol	U251	K562	MCF-7	PC-3	HCT-15
	25.0	36	32	s.a	9

Debido a que no se observó una actividad inhibitoria significativa del crecimiento tumoral, y según los criterios de selección establecidos se decidió no continuar con el estudio de esta especie.

4.2 *Annona montana* M.

Hay un gran interés existente para la familia Annonaceae debido a su uso biomédico, tales como plaguicida, antiparasitario, antimicrobiano, antimicótico, inmunosupresor, agentes citotóxicos y antitumorales [238]. *Annona montana* (nombre común guanábana montaña) es un árbol ampliamente distribuido en varias zonas subtropicales del mundo. En la medicina tradicional, la planta se utiliza principalmente en el tratamiento de los piojos, influenza y el insomnio [5], los extractos de esta planta o compuestos específicos de sus semillas y las hojas son conocidas por poseer acetogeninas con potencial citotóxico significativo en células de cáncer de pulmón, mama, próstata y colon [235,318]. Frutos inmaduros pulverizados tanto de *A. montana* y *A. muricata*, que son muy astringentes, sirven como remedio para la disentería [318]. Los efectos adversos de estas plantas ampliamente utilizadas no están bien documentados en la literatura. Se partió sobre la base de que su uso en seres humanos tiene baja toxicidad debido a su uso en la medicina tradicional, y que el potencial de los riesgos genotóxicos son el resultado de la utilización a largo plazo de las plantas [319]. A pesar de la información mencionada anteriormente, no hay estudios hasta la fecha en relación con el potencial dañino sobre el ADN de extractos de frutas. Por lo tanto, en la presente investigación se determinó un efecto genotóxico de los extractos del fruto inmaduro de la *A. montana* utilizando un ensayo de cometa en linfocitos humanos. Además, se analizó su efecto sobre la citotoxicidad de cinco líneas de células tumorales humanas. Para evaluar si los diversos extractos de *A. montana*

(metanol, hexano, y acetato de etilo) podrían afectar a la supervivencia de las células tumorales, se utilizó un ensayo de cristal violeta. Utilizando estas líneas celulares de cáncer, se demostró que el extracto de *A. montana* acetato de etilo (AcOEt) era más eficaz para inhibir la supervivencia de células tumorales (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas a 50 µg/mL de extractos del fruto inmaduro de *Annona montana*

Extracto (50 µg/mL)	% de inhibición				
	Líneas de cáncer humano				
	Pulmon A-549	Astrocitoma D-384	Mama MCF-7	Prostata PC-3	Colon RKO
<i>A. montana</i> M. Hex	77	98	84	97	87
<i>A. montana</i> M. AcOEt	100	100	96	100	100
<i>A. montana</i> M. MeOH	41	26	69	33	20

Dado que el extracto de AcOEt de *A. montana* fue el más eficaz para inhibir la supervivencia de células tumorales (Tabla 4) expusimos un panel de líneas celulares tumorales a 7 dosis diferentes que van de 0 a 50 µg/mL. En la Tabla 5 se muestra las CI_{50} del extracto de AcOEt del fruto inmaduro de *A. montana* en diversas líneas celulares, la CI_{50} para las células PC-3 fue mayor (13,12 µg/mL), mientras que las otras líneas celulares tenían una sensibilidad más alta, la CI_{50} más baja fue para células MCF-7 (6,06 µg/mL). Se han observado efectos similares en estudios con otras partes de *A. montana* M como: hojas, semillas y corteza [320–323].

Tabla 5. Determinación de la CI_{50} del extracto de acetato de etilo de fruto inmaduro de *A. montana*

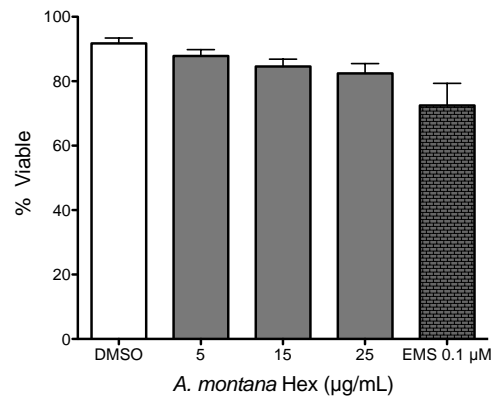
Línea celular humana	$CI_{50} \pm EEM^*$	
	<i>A. montana</i> M (AcOEt) $\mu\text{g/mL}$	Doxorubicin μM
A549 (pulmón)	9.6 ± 0.1	0.2 ± 7.4
D384 (astrocitoma)	7.9 ± 0.3	0.9 ± 2.7
MCF-7 (mama)	6.0 ± 0.1	1.4 ± 15.1
PC3 (próstata)	13.1 ± 0.1	0.1 ± 2.6
RKO (colon)	7.7 ± 0.1	0.3 ± 1.1

Cada dato representa la media y su error estándar (EEM) de al menos tres experimentos independientes.

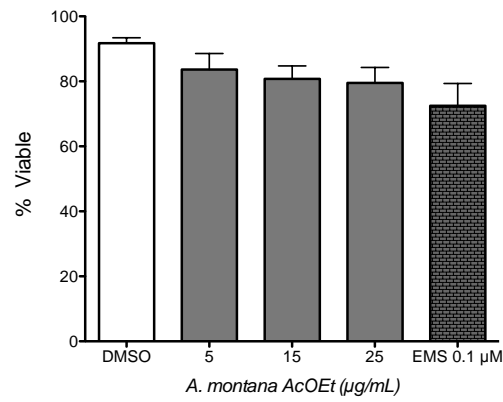
Para evaluar los efectos genotóxicos de los extractos de *A. montana*, se emplearon linfocitos humanos normales en proliferación como modelo biológico. Para establecer las dosis subtóxicas de trabajo en la prueba genotóxica, se evaluó el efecto citotóxico del extracto de *A. montana* sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante tinción de diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/EtBr). Los linfocitos se expusieron a varias dosis del extracto de *A. montana* durante 3 h y mostraron una viabilidad mayor que 70%, con el tratamiento de control y la exposición a varias dosis de extracto (Figura 11).

La versión alcalina del ensayo cometa detecta ADN con roturas de simple y doble cadena y sitios álcali lábiles [304,312,324,325]. La Figura 12 muestra los resultados del ensayo de cometa. Según los datos obtenidos a partir de la cola del cometa, los tres extractos de *A. montana* aumentaron la migración del ADN de la dosis más baja (5 $\mu\text{g/mL}$). También se puede observar un efecto dependiente de la dosis.

A



B



C

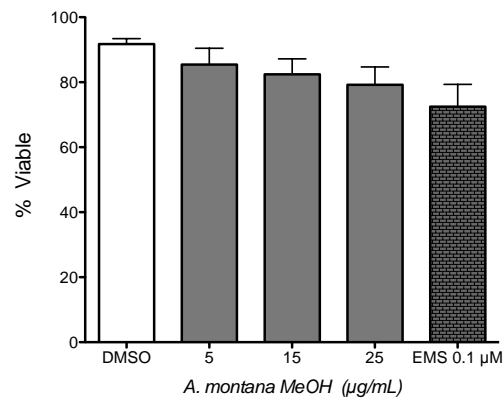


Figura 11. Viabilidad de linfocitos humanos expuestos a 5, 15 y 25 μ g/mL de extractos del fruto inmaduro de *A. montana*. A) *A. montana* Hex, B) *A. montana* AcOEt, C) *A. montana* MeOH. Los resultados se muestran como la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (n=18).

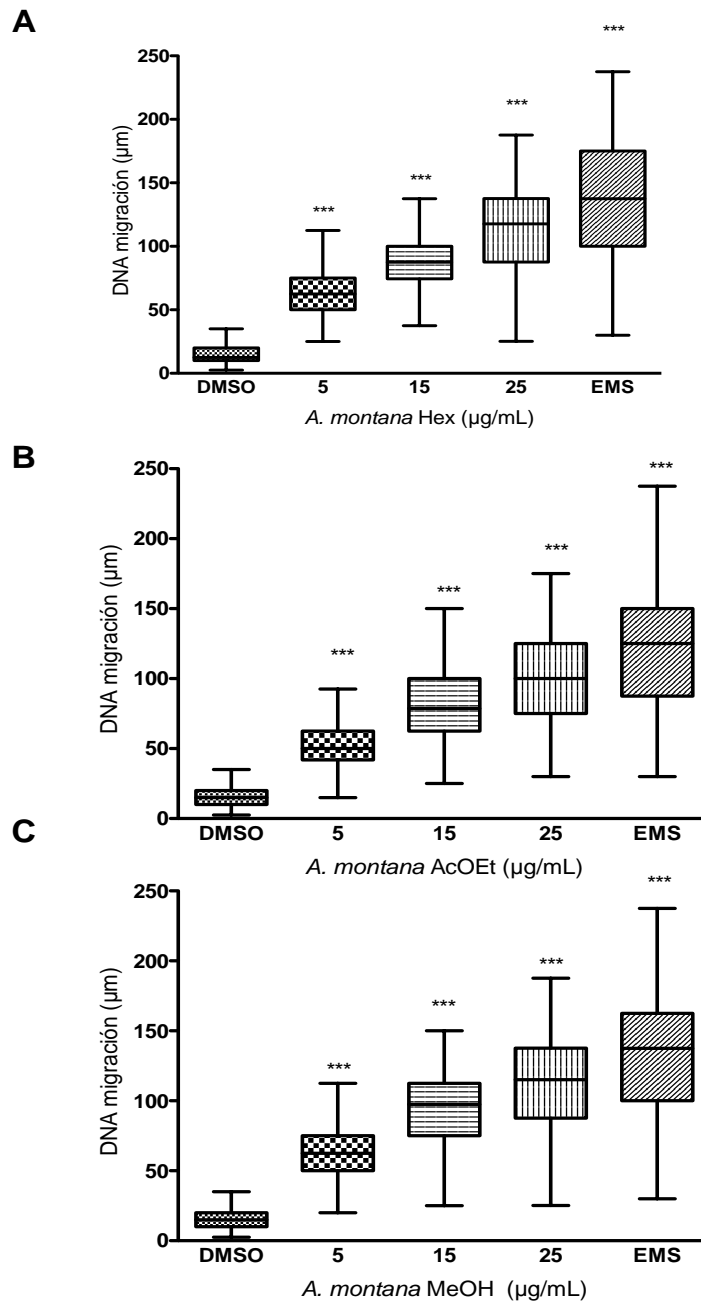


Figura 12. Genotoxicidad en los linfocitos humanos expuestos a 5, 15 y 25 µg/mL de los extractos del fruto inmaduro de *A. montana*. A) *A. montana* Hex, B) *A. montana* AcOEt, C) *A. montana* MeOH. Las cajas representa un rango, distancia intercuartil y una mediana de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (n=18). Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de control (Pruebas de Kruskal-Wallis y Dunns) *** p < 0,0001.

4.3 *Clusia latipes*

La familia Clusiaceae, también conocida como Guttiferae, consta de plantas tropicales y cubre alrededor de 27 géneros y 1090 especies [326]. La flora del sur de Ecuador, incluye un gran número de especies pertenecientes a ésta familia, cuyo género más representativo e importante es *Clusia*, conocido por su utilidad biomédica. Las especies de este género han mostrado diversas actividades biológicas, apoyando su papel como una prometedora fuente de fitocompuestos biomédicos activos que se pueden utilizar como antimicrobianos [327], contra el cáncer [328], antioxidantes, anti-inflamatorios, además también presentan actividades antihepatotóxicas, e inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [329] [330]. Las aplicaciones biomédicas más prominentes de estas especies son: el tratamiento de la lepra y dolores de cabeza, aplicaciones para tratar verrugas, así como para el control de la obesidad [331]. Las hojas de *Clusia* sp. a menudo se utilizan para suavizar la piel, y por lo tanto tener un beneficio potencial en el cuidado de la piel [332]. Este género presenta una gran variabilidad en términos de actividad biológica, lo que convierte en una posible fuente para obtención de metabolitos secundarios activos para ser utilizados como antitumorales.

4.3.1 Actividad citotóxica de los extractos de hojas *C. latipes* sobre líneas tumorales humanas

El efecto sobre la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTS en las líneas celulares de cáncer humanas tratadas durante 48 h con los diferentes

extractos de *C. latipes* (50 µg/mL). Todos los extractos ensayados inhibieron la viabilidad de todas las líneas celulares de cáncer (Tabla 7). Sin embargo, el extracto de hexano de hojas no inhibe la viabilidad de las células PC-3 de cáncer de próstata, mientras que mostró tener un efecto sobre la viabilidad de otras líneas celulares de cáncer utilizados en este estudio (inhibición por ~25-30%). El extracto de metanol mostró un efecto inhibitor bajo sobre células MCF-7 (~9,5%), mientras que la disminución de una viabilidad de las células de cáncer de próstata PC-3 por ~40%. El extracto AcOEt demostró ser el más activo en la disminución de la viabilidad de todas las líneas celulares de cáncer (en más de un 30%), y fue más eficaz para la línea celular PC-3 de cáncer de próstata (~ 44%).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas a 50 µg/mL de los extractos de hojas de *Clusia latipes*

Tratamiento (50 µg/mL)	% de inhibición ± EEM			
	Líneas de cancer humano			
	D384 (Astrocitoma Cerebral)	PC-3 (Prostata cancer)	MCF-7 (Mama cancer)	RKO (Colon cancer)
Hex	29 ± 4	1 ± 4	27 ± 5	25 ± 6
AcOEt	33 ± 2	44 ± 3	33 ± 3	31 ± 6
MeOH	24 ± 4	41 ± 3	9 ± 3	19 ± 4
Doxorrubicina 2 µM	77 ± 1	70 ± 3	75 ± 2	88 ± 1

Los datos representan la media y su error estándar (EEM) de al menos tres experimentos independientes.

4.3.2 Aislamiento, caracterización e identificación de metabolitos secundarios de las hojas de *C. latipes*

Se aislaron y caracterizaron de *Clusia latipes* (Figura 13) cuatro metabolitos secundarios. Del extracto de hexano (Hex), se obtuvieron 428 fracciones de 200

mL cada una. De la fracción # 53, que se eluyó con Hex: AcOEt (95: 5), se aislaron 36 mg de un sólido amorfo de color blanco, el cuál se identificó como friedelina (**32**). De la fracción # 102 eluida con Hex:AcOEt (80:20), 22 mg de un sólido fue aislado e identificado como friedolan 3-ol (**33**). A partir de la fracción # 302 eluida con AcOEt: MeOH (80:20), se obtuvieron 17 mg de sólido amarillo amorfo, el cual se aisló y se identificó como la hesperidina (**34**). Del extracto de acetato de etilo, se obtuvieron 309 fracciones. De la fracción # 83 eluida con Hex: AcOEt (90:10), se aislaron 8 mg de un sólido identificado como β -amirina (**35**). Todos los compuestos fueron identificados por comparación con los datos físicos y espectroscópicos, informados en la literatura [333][334][335][336][337].

Constantes físicas y espectroscópicas de:

Friedelina (**32**): p.f. 235-239 °C. EIMS m/z (%): 426 (M+, 38), 411 (12), 341 (7), 302 (16), 273 (31), 205 (27), 69 (100). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 0.66 (s, 2H), 0.78 - 0.98 (m, 15H), 1.11 - 1.35 (m, 17H), 1.37 - 1.58 (m, 8H), 1.66 - 1.71 (m, 1H), 1.79 - 2.03 (m, 2H), 2.10 - 2.38 (m, 3H) 7.19 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ ppm 6.9 (C-1), 14.8 (C-2), 18.1 (C-3), 18,3 (C-4), 18.8 (C-5), 20.4 (C-6), 22.8 (C-7), 29.3 (C-8), 29.5 (C-9), 29.5 (C-10), 29.7 (C-11), 29.8 (C-12), 29.8 (C-13), 30.1 (C-14), 30.6 (C-15), 32.2 (C-16), 32.5 (C-17), 35.4 (C-18), 35.7 (C-19), 36.1 (C-20), 37.5 (C-21), 38.4 (C-22), 39.4 (C-23), 39.8 (C-24), 41.4 (C-25), 41.6 (C-26), 42.2 (C-27), 42.9 (C-28), 53.2 (C-29), 213.4 (C-30).

Friedolan 3-ol (**33**): m.p. 238- 241 °C. EIMS m/z (%): 428 (M+, 20), 413 (27), 395 (7), 341 (3), 304 (2), 275 (23), 207 (11), 69 (100). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ

3.72 (1H, bd, J = 3.1 Hz, H-3), 1.86 (1H, dt, J = 10.1, 3.0 Hz, H-2a), 1.70 (1H, dt, J = 12.8, 3.1 Hz, H-6a), 1.57 (1H, m, H-2b), 1.16 (3H, s, H-28), 0.99 (3H, s, H-29), 0.97 (6H, s, H-26 and H-27), 0.95 (3H, s, H-30), 0.94 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-23), 0.93 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-25). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 15.8 (C-1), 35.1 (C-2), 72.3 (C-3), 49.2 (C-4), 37.1 (C-5), 41.7 (C-6), 17.9 (C-7), 53.3 (C-8), 37.8 (C-9), 60.2 (C-10), 35.2 (C-11), 30.6 (C-12), 39.4 (C-13), 39.8 (C-14), 32.9 (C-15), 36.1 (C-16), 30.0 (C-17), 42.9 (C-18), 36.2 (C-19), 28.3 (C-20), 32.1 (C-21), 39.3 (C-22), 11.6 (C-23), 16.4 (C-24), 18.2 (C-25), 18.8 (C-26), 20.1 (C-27), 32.3 (C-28), 35.0 (C-29), 31.9 (C-30).

Hesperidina (**34**): p.f. 258-259 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.08 (1H, d, J = 6.0, H-6"), 2.77 (1H, dd, J = 3.11, 15.11, H-3eq), 3.07 (1H, dd, J = 13.8, 12.0, H-3ax), 3.09-3.86 (2H, m, H-2"-H-5"), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃), 4.52 (1H, d, J = 7.8, H-1"), 4.97 (1H, s, H-1""), 5.49 (1H, dd, J = 3.11, 15.11, H-2), 6.12 (1H, sl, H-8), 6.15 (1H, sl, H-6), 6.92 (3H, m, H-2', H-5', H-6'), 12.06 (1H, s, 5-OH), ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 78.4 (C-2), 42.1 (C-3), 197.0 (C-4), 163.1 (C-5), 96.4 (C-6), 165.2 (C-7), 95.6 (C-8), 162.5 (C-9), 103.3 (C-10), 130.9 (C-1'), 114.2 (C-2'), 146.5 (C-3'), 147.9 (C-4'), 112.0 (C-5'), 117.9 (C-6'), 100.6 (C-1"), 73.0 (C-2"), 76.3 (C-3"), 69.6 (C-4"), 75.5 (C-5"), 66.1 (C-6"), 99.5 (C-1""), 70.3 (C-2""), 70.7 (C-3""), 72.1 (C-4""), 68.3 (C-5""), 17.8 (C-6""), 55.7 (4'-OCH₃).

β-amirina (**35**) m.p: 238- 241 °C. EIMS m/z (%): 426 (M+, 51), 411 (20), 341 (10), 287 (13), 273 (61), 246 (33), 220 (18), 205 (57), 161 (29), 125 (85), 95 (100), 69 (97), 55 (56), 41 (30). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.68 (1H, d, J = 11.0), 0.73

(1H, s), 0.77 (1H, s), 0.80 (1H, s), 0.87 (1H, s), 0.90 (1H, s), 0.93 (1H, s), 1.07 (1H, s), 1.19 (1H, s), 1.70 (1H, td, J = 4.3, 13.5 Hz), 1.8 (1H, m), 1.89 (1H, td, J = 4.0, 14.0 Hz), 1.93 (1H, dd, J = 4.0, 13.7 Hz), 3.15 (1H, dd, J = 4.4, 10.8 Hz, H-3), 5.12 (1H, t, J = 3.2). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 38.7 (C-1), 27.2 (C-2), 79.3 (C-3), 38.5 (C-4), 55.1 (C-5), 18.6 (C-6), 32.4 (C-7), 39.8 (C-8), 47.6 (C-9), 36.9 (C-10), 23.6 (C-11), 121.7 (C-12), 145.2 (C-13), 41.7 (C-14), 26.2 (C-15), 26.1 (C-16), 32.6 (C-17), 47.2 (C-18), 46.8 (C-19), 1.0 (C-20), 34.6 (C-21), 37.2 (C-22), 28.1 (C-23), 15.3 (C-24), 15.3 (C-25), 16.7 (C-26), 25.7 (C-27), 28.5 (C-28), 33.8 (C-29), 23.7 (C-30).

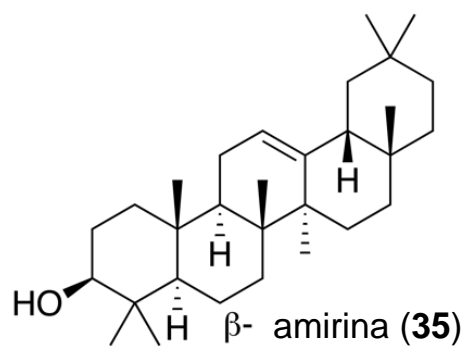
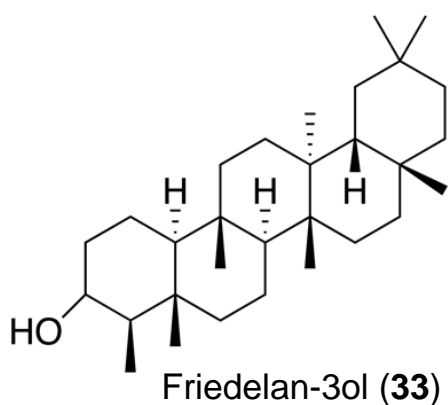
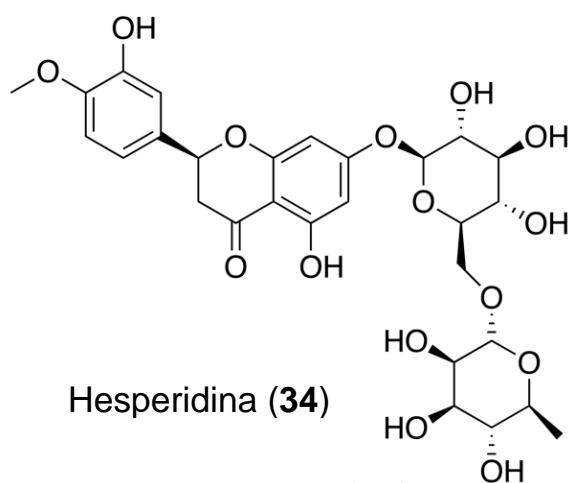
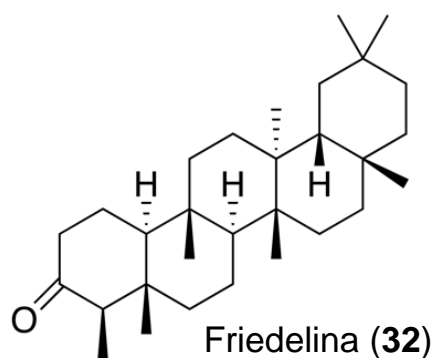


Figura 13. Metabolitos secundarios aislados de hojas de *C. Latipes*

4.3.3 Actividad genotóxica sobre linfocitos humanas del extracto hexánico de hojas de *C. latipes*

Debido a la presencia de hesperidina en el extracto de hexano, un flavonoide conocido por sus propiedades anti-tumorales [338-340], se analizaron los posibles efectos citotóxicos y genotóxicos del extracto hexánico de *C. latipes* utilizando la doble tinción con diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/EtBr) y el ensayo cometa, respectivamente. La viabilidad de las células después de la exposición al extracto HexCl (25, 35 y 50 mg/mL) fue mayor que 70 % (Figura 14A), sin embargo estas dosis no fueron citotóxicas. Los efectos genotóxicos determinados por el ensayo cometa muestran una respuesta dependiente de la dosis. Las tres dosis probadas del extracto mostraron una disminución de la longitud de la cola del cometa significativa ($p < 0,001$) (Figura 14B).

La β -amirina, friedelina y la presencia de friedolan-3-ol son consistentes con compuestos comúnmente aislados de otras especies del mismo género [341][342][343]. Sin embargo, en este trabajo, hemos aislado e identificado la presencia de hesperidina de hojas de *C. latipes*, lo que representa el primer reporte de esta molécula para el género *Clusia* sp. La presencia de hesperidina puede justificar el uso de *C. latipes* en la medicina tradicional y cuidado de la piel, ya que esta flavona ha demostrado inhibir las lesiones de la dermatitis atópica y la elevación en el plasma de la IgE en ratones NC/Nga [344], así como para estimular la proliferación epidérmica en la piel normal de ratón [345].

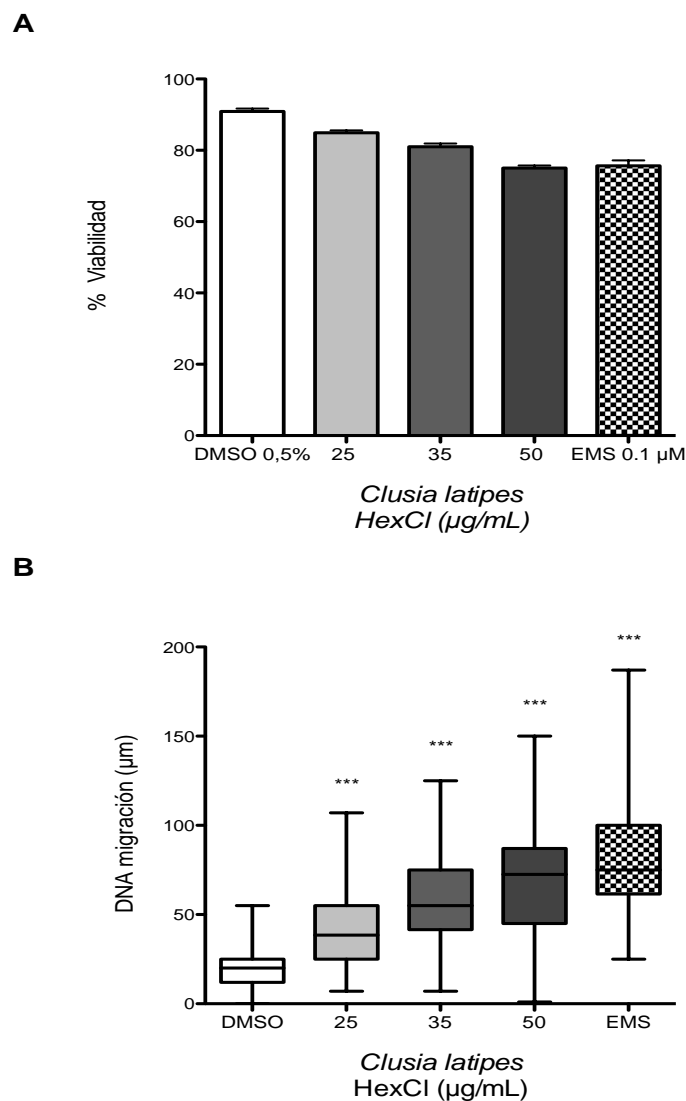


Figura 14. Efectos de citotoxicidad y genotoxicidad del extracto hexánico de hojas de *Clusia latipes* en linfocitos en proliferación expuestos a 25, 35 y 50 µg/mL. A) Viabilidad celular determinada por la FDA / EtBr. B) daño en el ADN determinada mediante el ensayo del cometa. Etil metano sulfonato (EMS) fue utilizado como un control positivo. *** P < 0,0001 diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Prueba de Kruskal-Wallis y Dunns).

Además, el efecto anti-proliferativo observado de los extractos en las células cancerosas seleccionadas podría atribuirse a la presencia de los dos triterpenos: friedelina (**32**), y friedolan-3-ol (**33**), así como la hesperidina (**34**), que han

mostrado actividades similares en otros estudios. La CI_{50} de friedelina y friedolan-3-ol en células CEM-SS y HeLa es del 11,4 y 6,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente [346]. La hesperidina ha demostrado una actividad anti-proliferativa en diferentes tipos de líneas celulares, incluyendo cáncer de mama [347] y cáncer de colon [348]. Además, la hesperidina muestra efectos citotóxicos en las líneas celulares que muestran la resistencia a los medicamentos, que se relacionan con la función de transportador de ABC [226].

El extracto de HexCI indujo un aumento significativo ($p < 0,001$) en el daño en el ADN en los linfocitos expuestos a las concentraciones utilizadas en este estudio. Puesto que los metabolitos secundarios de los extractos pudieran interaccionar con la maquinaria celular oxidativa que produce las especies reactivas del oxígeno, se sugiere que los extractos probados podrían conducir a una formación de radicales libres, y posteriormente inducir el rompimiento de la cadena de ADN.

4.4 *Gynoxys verrucosa*

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos aislados de plantas que a menudo se utilizan en la medicina tradicional contra la inflamación y el cáncer. El mayor número de lactonas sesquiterpénicas se encuentran en la familia Asteraceae, con más de 3.000 estructuras reportadas [349]. Uno de los miembros de esa familia, la planta *Gynoxys verrucosa* Wedd conocido como "guángalo" o "congona", es un arbusto que crece en las provincias de Loja y Zamora-Chinchipec. Se utiliza por la población indígena con fines medicinales para verrugas y como antiinflamatorio [177]. Entre los metabolitos secundarios aislados de esta especie esta una lactona sesquiterpénica, la Dehidroleucodina (DhL), que posee actividades anti-inflamatorias, anti-parásitarias y anti-microbianas [350]. Del extracto metanólico de *G. verrucosa* fue aislada y caracterizada la Dehidroleucodina, por el Dr. Omar Malagón del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja (Figura 15A). Se utilizó el ensayo de MTT para evaluar la actividad inhibidora del crecimiento celular del extracto de metanol de *G. verrucosa*. Usando cuatro líneas celulares de cáncer (Tabla 9), se demostró que el extracto de metanol de *G. verrucosa* fue más eficaz para inhibir la supervivencia celular de las células D384 de astrocitoma cerebral (Tabla 9). La DhL es capaz de inhibir el crecimiento de células de todas las líneas celulares tumorales ensayadas, especialmente las células D384 de astrocitoma humano (Tabla 9).

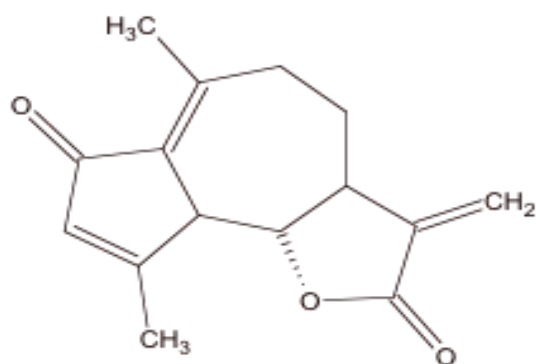
Tabla 9 Porcentaje de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares expuestas al extracto metanólico de hojas de *Gynoxys verrucosa* y Dehidroleucodina (DhL).

Tratamiento	CI ₅₀ µg/mL ± EE			
	Líneas celulares de cáncer humano			
	D384 (Astrocitoma)	A549 (Pulmón)	MCF-7 (Mama)	CAKI (Riñón)
Extracto MeOH <i>G. verrucosa</i>	11 ± 1	30 ± 1	32 ± 1	18 ± 1
Dehidroleucodina	81 ± 2	70 ± 2	69 ± 4	69 ± 4
Doxorrubicina	82 ± 1	74 ± 4	36 ± 3	47 ± 4

4.4.1 DhL modula la viabilidad celular de las células tumorales, especialmente de las células D384

Se utilizó el ensayo de viabilidad celular MTT con células D384 tratadas con diversas concentraciones de DhL (5, 7.5, 10, 15 y 20 µM) durante 16 h (después de un ciclo de replicación). Las células cancerosas fueron viables hasta 10 µM, mientras que con la concentración de 15 µM la viabilidad de las células D384 se redujo drásticamente (~40%, Figura 15B).

A



Dehidroleucodina

B

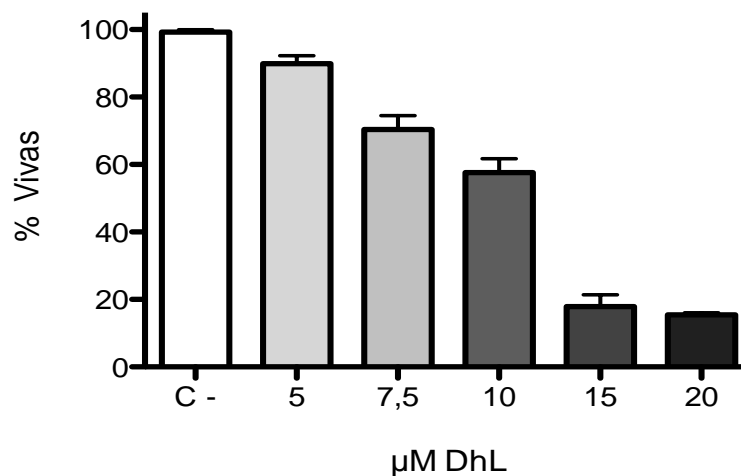


Figura 15. Viabilidad de la Dehidroleucodina. **A** Dehidroleucodina. **B.** Porcentaje de viabilidad celular. Células D-384 expuestas a diferentes concentraciones de DhL (5, 7.5, 10, 15 y 20 µM) por 16 horas. Se usó para el análisis estadístico ANOVA-post test Dunnet ($*p < 0.005$, $***p < 0.0001$). Cada barra representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado ($n=6$ ($**p < 0.001$)).

Cuando las células D384 fueron expuestas a diferentes concentraciones de DhL por 16 h, las células mostraron ciertos cambios morfológicos (Figura 16). Las células de cáncer tratadas con control negativo mostraron la morfología característica de la línea celular y ~ 60% de confluencia. Sin embargo a las concentraciones de 5 y 7.5 μM se observó una disminución de la confluencia, mientras que la morfología de las células permaneció intacta. En las dosis de 10 y 15 μM existieron cambios morfológicos más obvios. Cuando las células se expusieron a 2 ciclos de replicación (32 h), en el control la confluencia fue de ~80%, mientras que los efectos citotóxicos se acentuaron a 15 μM (Figura 16). Estas observaciones, así como datos de viabilidad celular sugirieron que DhL muestra efectos distintos en función de la dosis utilizada (citostático en dosis baja y citotóxico a dosis alta).

Como se muestra en la Figura 17A, el índice mitótico de las células D384 disminuyó en todas las concentraciones de una manera dosis-respuesta, en comparación con el control negativo. El IR del control 0.176 disminuyó significativamente a 0.055 en la concentración más alta ensayada de 10 μM ($p < 0,0001$). Usando un ensayo de incorporación de BrdU (Figura 17A), en las concentraciones ensayadas de DhL, el porcentaje de células disminuyó en la segunda y tercera mitosis, mientras que se incrementó la cantidad de células en la primera mitosis (en comparación con el control), en todas las dosis probadas (Figura 17B).

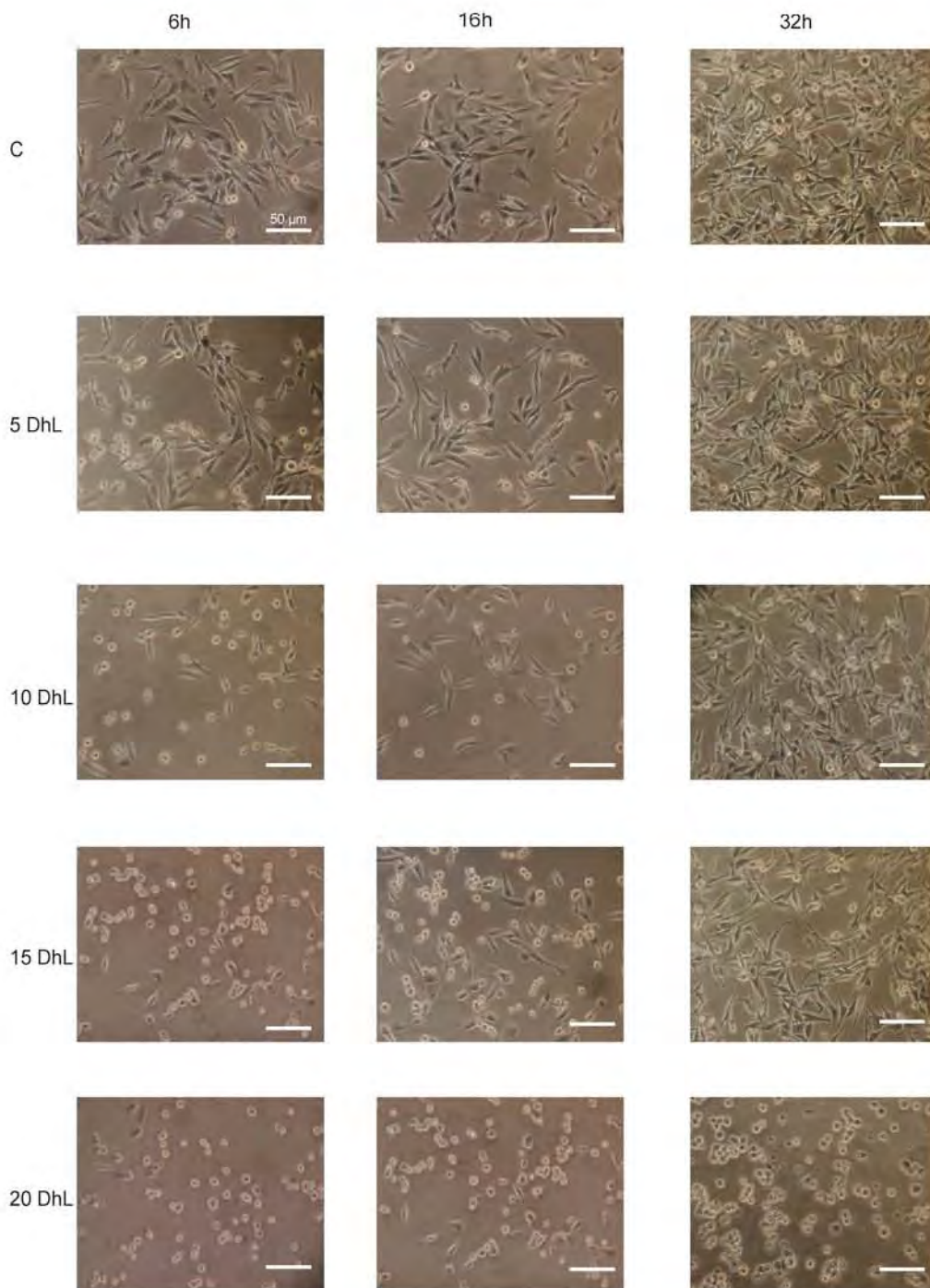


Figura 16. Cambios morfológicos de las células D-384 luego de 16 y 32 h de exposición a concentraciones de 5, 7.5, 10 y 15 μM de DhL. Observadas en microscopio invertido con contraste de fases (Nikon) (Magnificación 40X).

Este efecto se confirmó mediante el establecimiento del índice de replicación (IR) (Figura 17C), a la concentración de 10 μM de DhL el IR fue de 1,255 el cual disminuyó en comparación con el obtenido para el control negativo (1,875, $p < 0,001$).

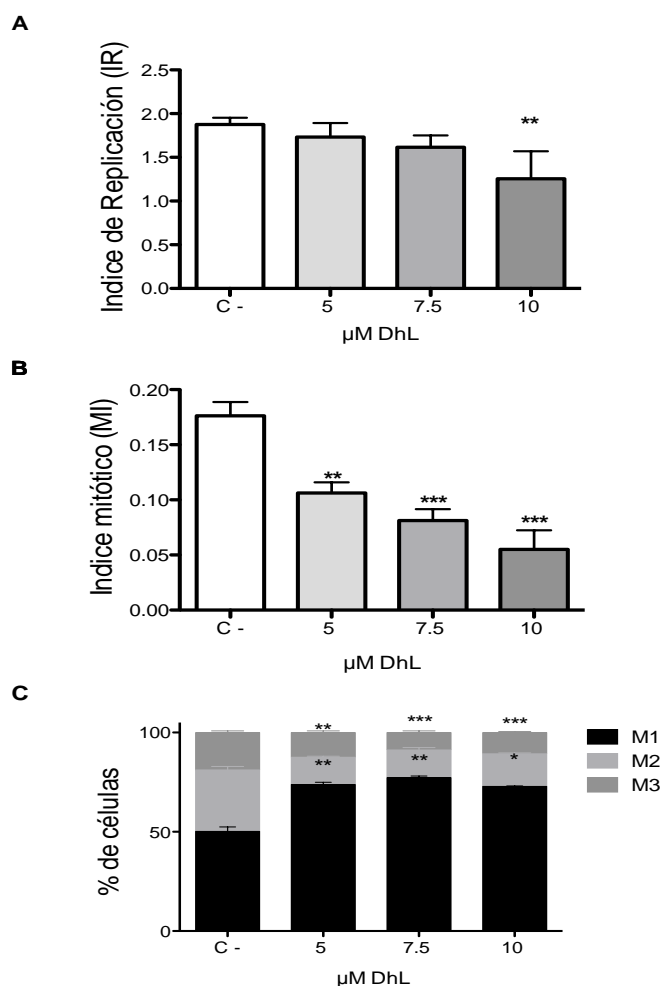


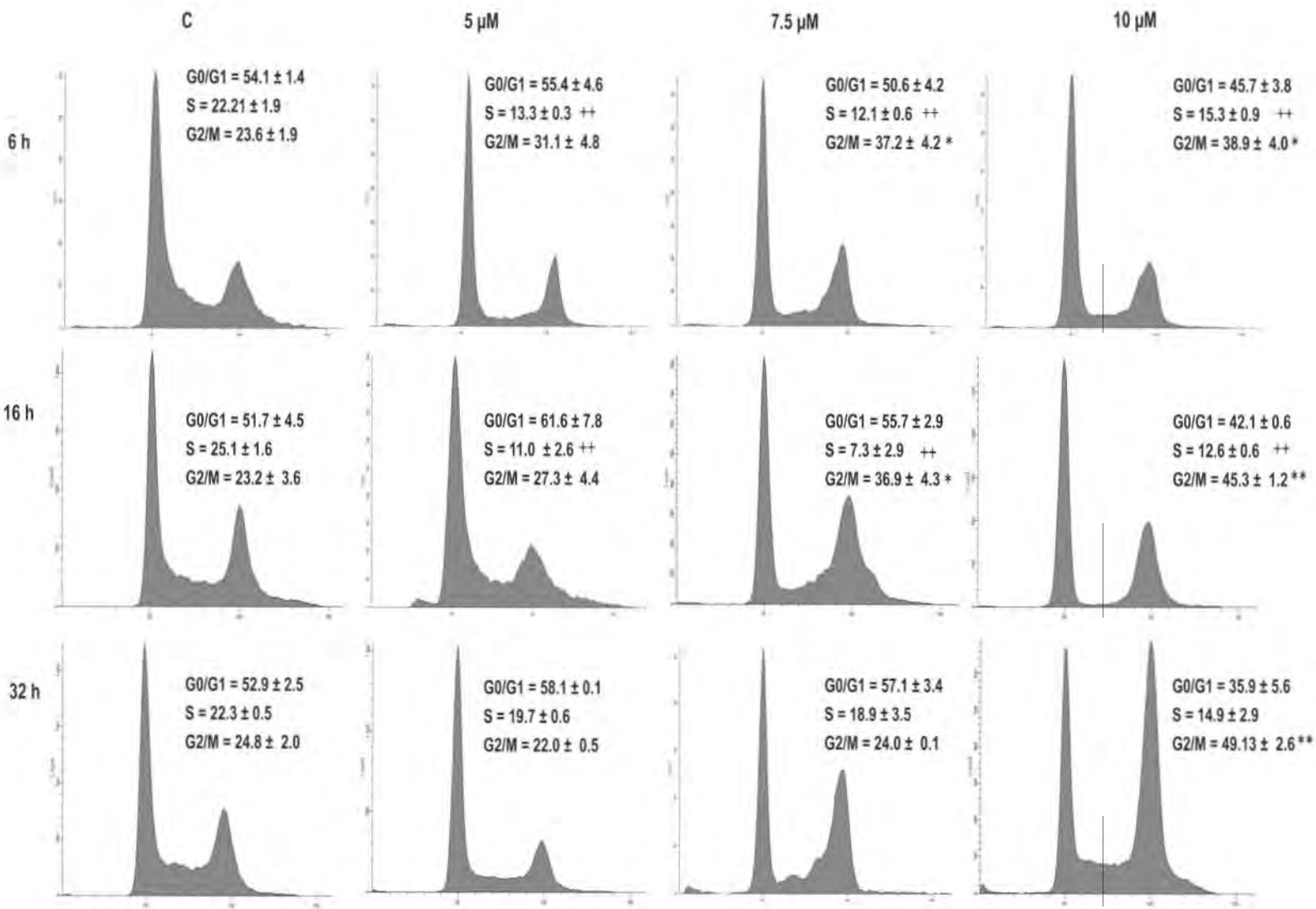
Figura 17. Efectos citostáticos de la Dehidroleucodina. **A** Índice mitótico. Representación gráfica del IM de células D-384 tratadas con diferentes concentraciones de DhL por 32 h de exposición. **B.** Células en mitosis. Porcentaje de células D384 en metafases M1, M2 y M3 luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de DhL por 32 h. **C.** Índice de replicación (IR). Representación gráfica del IR de células D-384 tratadas con diferentes concentraciones de DhL, luego de 32 horas de exposición. Cada barra representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado ($n=6$) (** $p < 0.001$).

4.4.2 DhL muestra efecto citostático sobre las células D384 a través de la detención del ciclo celular y apoptosis

A continuación se probó el efecto de la DhL en la distribución del ciclo celular en las mismas concentraciones (5, 7.5 y 10 μM) a diferentes tiempos (6 h, 16 h y 32 h). Se demostró que la exposición de las células D384 a todas las concentraciones de DhL para 6 h y 16 h indujo la disminución significativa del porcentaje de células D384 en la fase S en comparación con el control ($p < 0,0001$) acompañado por un aumento en el porcentaje de células en fase G2/M (Figura 18). Aunque la exposición de las células D384 a concentraciones de 5 y 7.5 μM de DhL a 32 h no mostró ningún cambio con respecto al control, en las células con 10 μM de DhL a las 6 h y 12 h hubo una disminución de un número de células en la fase G0/G1 acompañado por un aumento de un número de células en la fase G2/M.

Así mismo, se examinó el efecto citotóxico de la DhL en las dosis más altas (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM). La Figura 19 muestra los resultados de análisis por citometría de flujo de las células D384 utilizando el ensayo de anexina V-IP. Se observó que las dosis crecientes de DhL inducen migración de las células D384 del cuadrante de células vivas a los cuadrantes de células apoptóticas tempranas y células apoptóticas tardías.

Figura 18. Ciclo celular de las células D-384 expuestas a 6, 16 y 32 h a las distintas concentraciones de DhL (5, 7.5 y 10 μ M) y el control negativo.



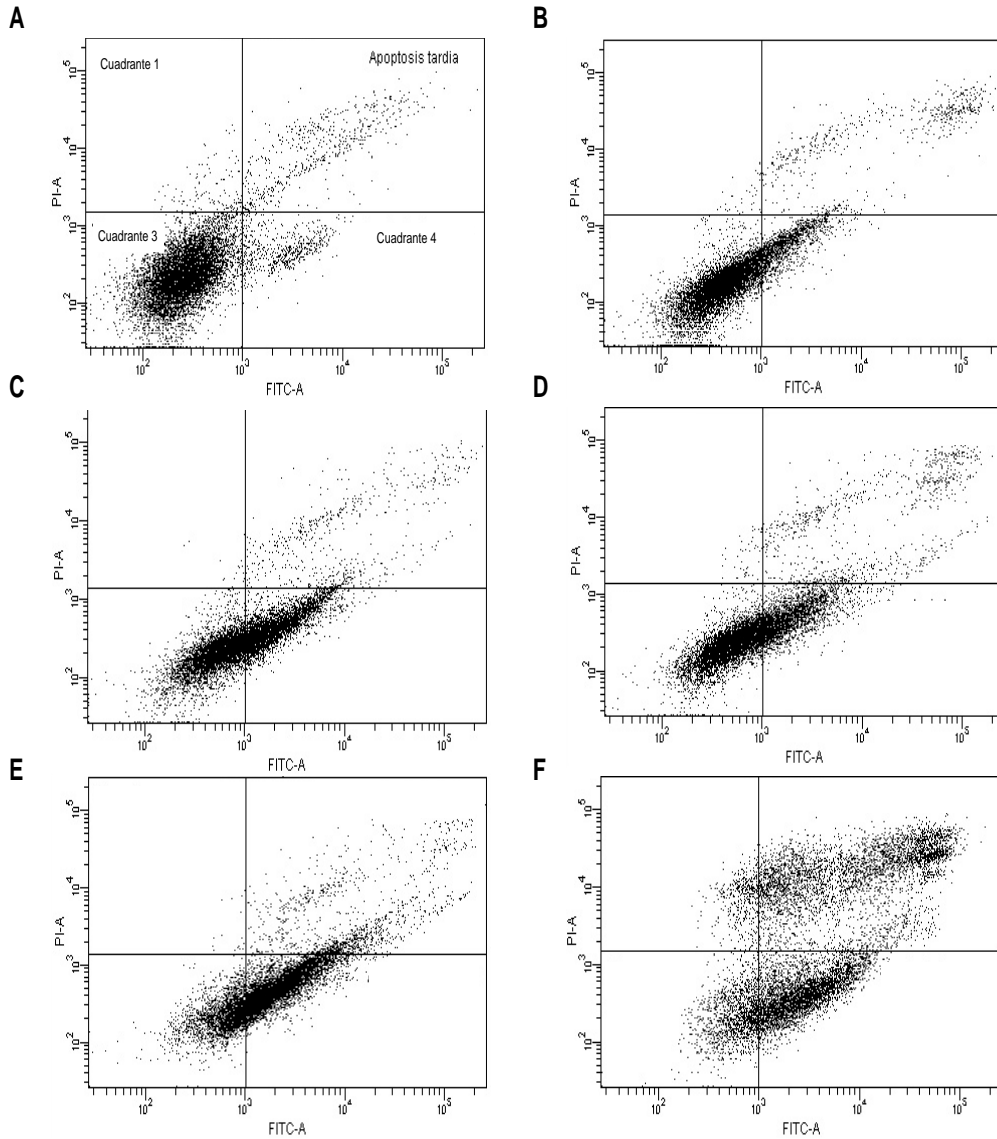


Figura 19. Efecto apoptótico de DhL en células D384. Se detectó la apoptosis de las células D384 y monitoreado por Anexina V-FITC/PI. Se muestra el histograma representativo para cada concentración de DhL. **A.** Control sin DhL (DMSO); **B,** 10 μM DhL; **C,** 12,5 μM DhL; **D,** 15 μM DhL; **E,** 17,5 μM DhL; y **F,** 20 μM DhL. Cuadrante 1, PI (+) (células que experimentan necrosis); Cuadrante 2, Anexina V-FITC (+) PI (+) (células en apoptosis tardía y necrosis temprana); Cuadrante 3, Anexina V-FITC (-) PI (-) (células vivas); Cuadrante 4, Anexina V-FITC (+) PI (-) (células de la apoptosis temprana).

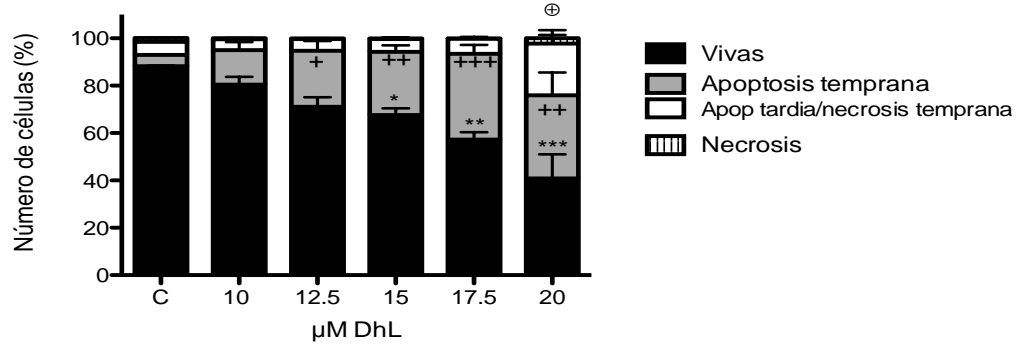
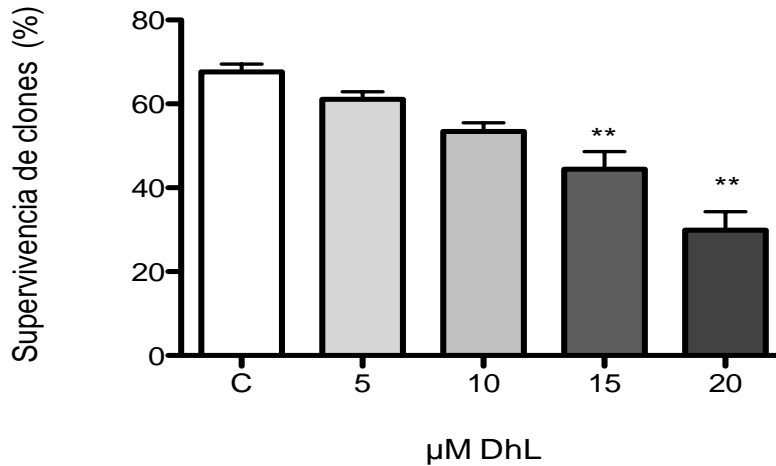
A**B**

Figura 20. Porcentaje de apoptosis de las células D-384 y Supervivencia celular. A) Apoptosis de las células D-384 detectada por Anexina V-FITC / PI. Porcentaje de células vivas (barras negras), las células en apoptosis temprana (barras grises), células en apoptosis tardía/necrosis temprana (barras blancas) y las células en necrosis tardía (barras de línea). Los datos representan la media \pm EEM, $n = 4$. Los símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ con respecto a controlar las condiciones para las células vivas, + $p < 0,01$, ++ $p < 0,001$ y +++ $p < 0,0001$ con respecto para control las condiciones para la apoptosis temprana, $\oplus p < 0,01$ con respecto al control de las condiciones finales de la apoptosis tardía/necrosis temprana. B) Supervivencia celular. El número de colonias contadas se expresó como un porcentaje del control de células sembradas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 4$) de 3 experimentos independientes, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ comparados con el control.

El porcentaje de células vivas del control fue del 88%, mientras que en la dosis más alta de DhL fue del 40,8% (Figura 20A). Como se muestra en la Figura 20A, la tasa de células en apoptosis temprana en el control fue de ~4,8%, mientras que este valor se incrementó significativamente después del tratamiento con 17.5 μ M DhL (~ 38,4%) y de 20 μ M DhL (~ 33,3%). Al mismo tiempo, también se incrementó la tasa de células apoptóticas tardías cuando se comparó entre las células D384 tratadas con células de control (5,5%) y expuestas a 20 μ M DhL (19,5%). De acuerdo con los datos de supervivencia celular, el efecto citostático era temporal, ya que después de eliminar la DhL, la viabilidad celular D384 se revirtió a un nivel por encima de 80% a 10 μ M; mientras que para las dosis más altas de DhL el efecto citotóxico se mantuvo ya que la supervivencia celular de las células no habían superado ~ 44% en comparación con control (Figura 21B).

4.4.3 DhL indujo la expresión de p73 total y la fosforilación de p73 y p53 en las células D384

Miembros de la familia p53 (p53, p63 y p73) desempeñan un papel fundamental en la regulación de la detención del ciclo celular, apoptosis, autofagia y el metabolismo en las células tumorales expuestas a agentes que dañan el ADN y en el estrés inducido por diversos orígenes [288]. Por lo tanto, se examinó si el fenotipo de muerte celular inducida por la DhL implicaba la expresión de estos factores de transcripción en células D384. La participación de los miembros de la familia p53 en las células tumorales en respuesta a DhL confirmó las observaciones iniciales sobre el ciclo celular, la DhL indujo la expresión del

regulador del ciclo celular, CKND1A (p21), un blanco de todos los miembros de la familia p53. Se utilizaron los lisados proteicos totales obtenidos a partir de células D384 control y tratados con las dosis crecientes de DhL (12,5, 15 y 17.5 μ M durante 16 h), se encontró que la expresión de p21 se incrementó tras la exposición de la DhL de una manera dependiente de la dosis (Figura 21A). Además se encontró que uno de los otros blancos moleculares de los miembros de la familia p53, el activador apoptótico BAX, también fue regulado en células D384 con la exposición a DhL (Figura 21A). Aunque el aumento de la proteína BAX proapoptótico soporta el mecanismo de apoptosis implicados en respuesta a DhL, el no observar los cambios de expresión asociados con la caspasa-3 sugiere distinta vía de señalización de apoptosis (cascada de caspasas intrínseca o mitocondrial) para lo cual sería necesario futuros estudios de otras caspasas. Mientras que el aumento en los niveles de fosforilados de γ -H2AX (P139-H2AX) sugiere el efecto genotóxico de DhL sobre las células D384.

Se observó que mientras la expresión de p53 total no cambió en las células D384 tratadas con las concentraciones crecientes de DhL, el nivel total de p73 se incrementó marcadamente (Figura 21B). Por otra parte, también existió un incremento en los niveles de p53 fosforilado (serina-46, S46) y p73 fosforilado (tirosina-99, Y99) lo que sugiere la participación de las proteínas quinasas (HIPK2 y ABL, respectivamente) en los eventos moleculares que subyacen a la célula de astrocitoma en respuesta a DhL (Figura 21). En conjunto, estas observaciones apoyan la idea de que el fenotipo de la muerte celular observada en las células D384 tras la exposición DhL muy probablemente involucran múltiples eventos moleculares regulados por p73 y quizás también por S46-p53 y p73-Y99.

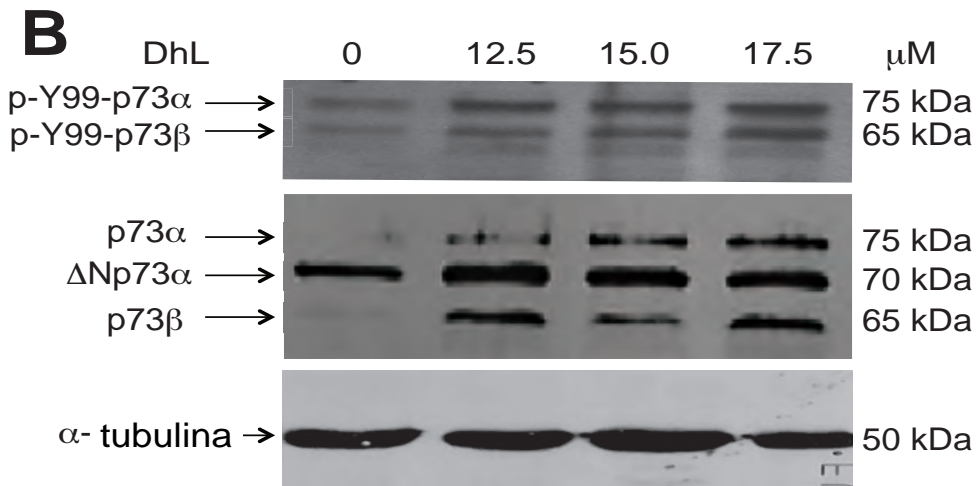
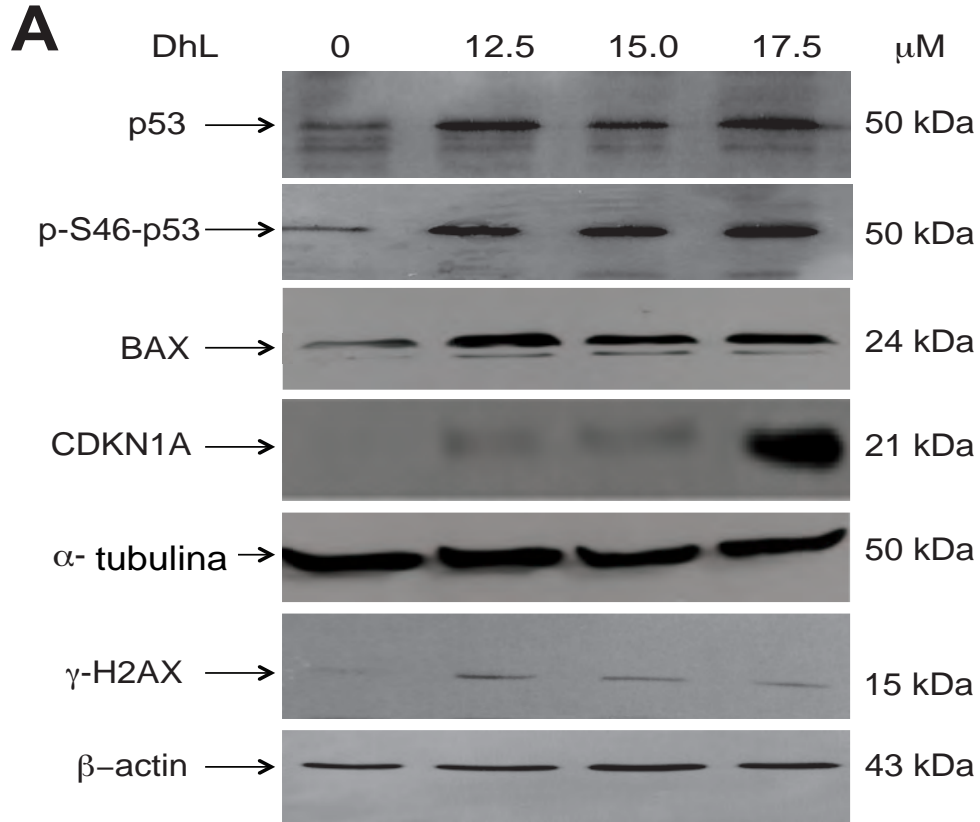


Figura 21 Expresión de proteínas en D-384 células tras la exposición de DhL. Células D-384 fueron expuestas a 12.5, 15 y 17.5 μM DhL durante 16 h. Se realizó análisis de Western usando anticuerpos para la caspasa 3, Bax, Bcl-1, p21, p53, p53 fosforilada, p73, p73 fosforilada, γ H2A.X fosforilada, actina y tubulina como controles de carga de proteína.

4.4.4 DhL muestra las actividades citostáticos/genotóxicos en linfocitos humanos

Como todas las lactonas sesquiterpénicas, la DhL podría interactuar con el ADN y proteínas, motivo por el cual se analizó el potencial efecto genotóxico de DhL usando como modelo biológico, linfocitos humanos en proliferación y ensayos *in vitro* de genotoxicidad (ensayo CBMN y ensayo cometa). Para establecer, que las dosis de trabajo son subtóxicas en las pruebas de genotoxicidad, se estableció el efecto citotóxico de DhL sobre linfocitos humanos en proliferación mediante el diacetato de fluoresceína (FDA)/ tinción con bromuro de etidio. Las células (linfocitos) fueron expuestas a DhL durante 24 h y no existió disminución de la viabilidad en cualquiera de las dosis ensayadas, a diferencia de las células tumorales (Figura 22A). Se evaluó el efecto de DhL en la cinética de la proliferación celular de linfocitos (CPC), y se calculó el índice de división nuclear (IDN), usando ambos parámetros (CPC y IDN) como criterios citostáticos para la proliferación de linfocitos humanos. Los efectos de la DhL sobre la proliferación celular se evaluaron contando la proporción de células monucleadas, binucleadas, y polinucleadas. Cuando los linfocitos fueron expuestos a DhL durante 24 h, aumentó el porcentaje de células mononucleadas, mientras que el porcentaje de células polinucleadas se redujo (Figura 22B). Además, la DhL disminuyó la proliferación de linfocitos evaluados por IDN sugiriendo que actúa como agente citostático en el modelo de linfocitos humanos (Figura 22C).

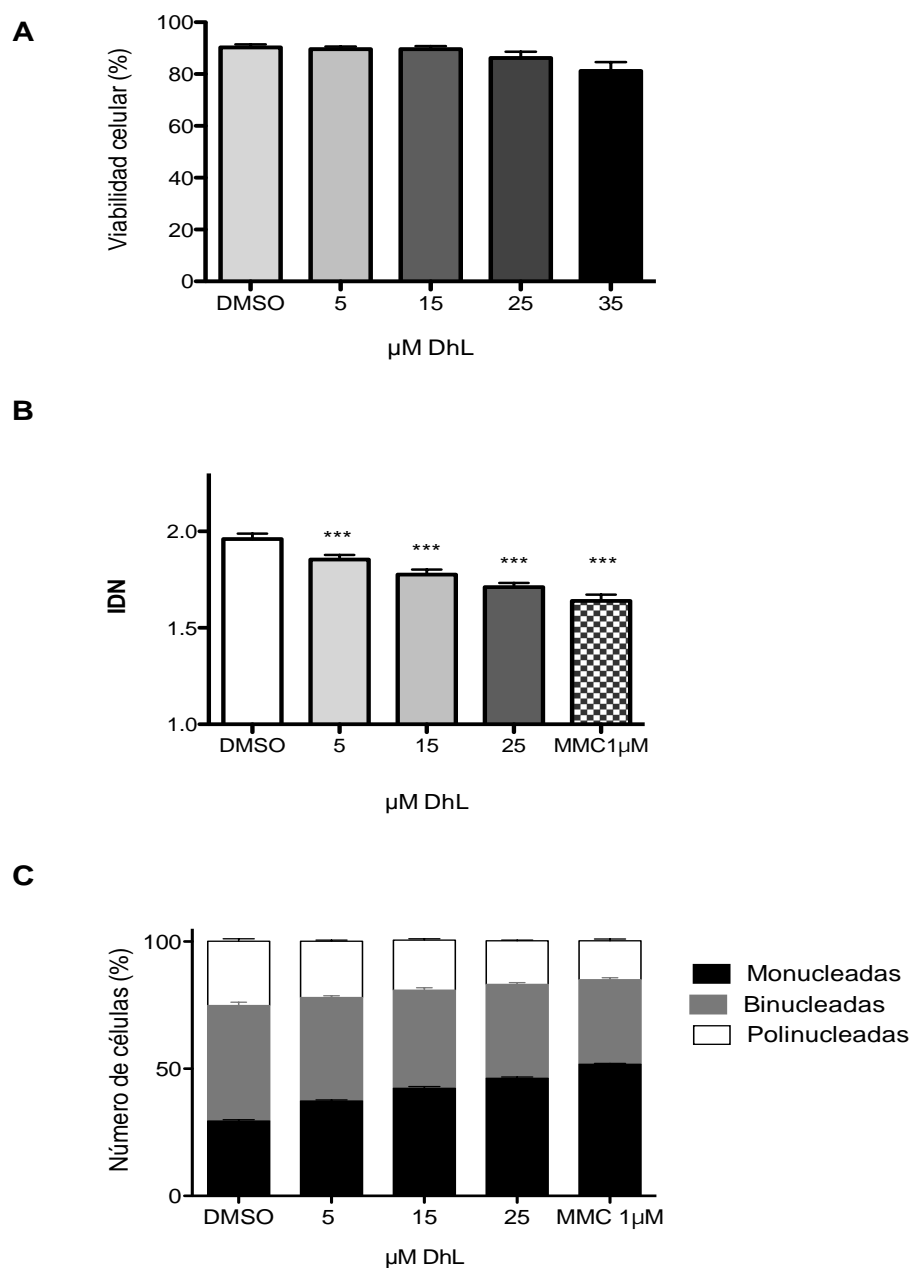


Figura 22. Viabilidad celular e índice de proliferación de linfocitos humanos expuestos a DhL (5, 15 y 25 mM). A) Viabilidad celular. B) Cinética de proliferación de linfocitos. Porcentaje de células monucleadas, binucleadas y polinucleadas. La mitomicina C (MMC) se utilizó como control en 1 μ M de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (n=18). ANOVA-Bonferroni. (* p <0,005, ** p <0,001, *** p <0,001).

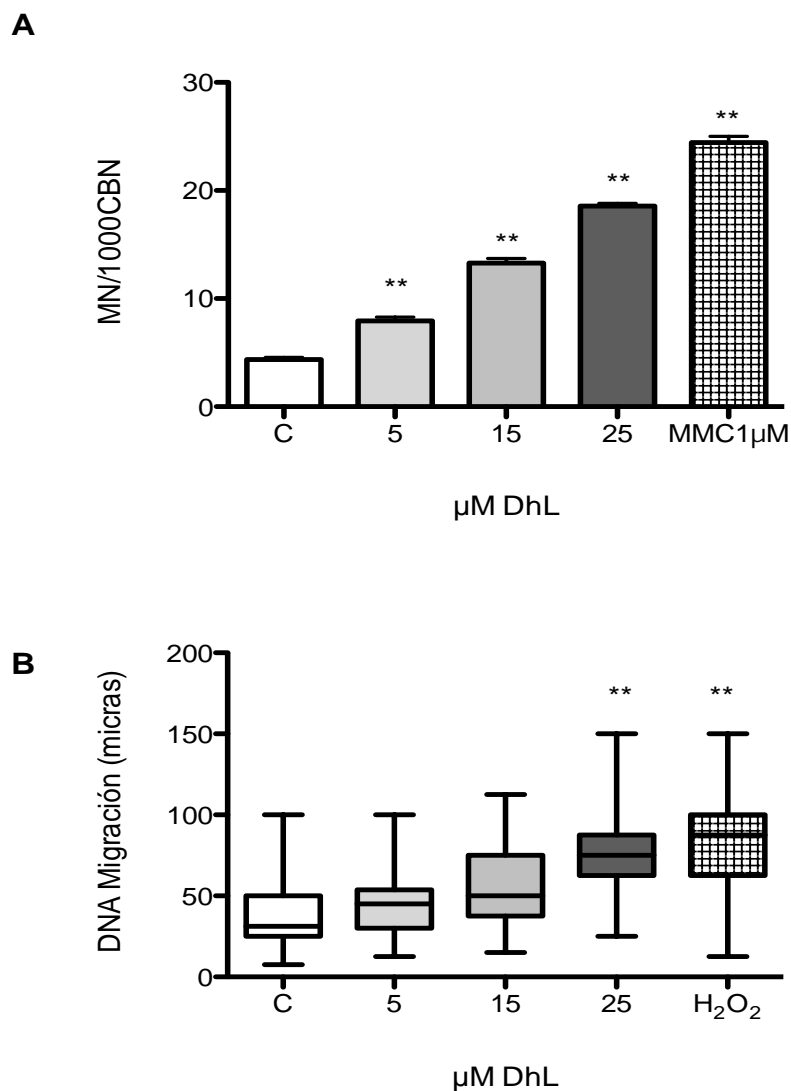


Figura 23 Efecto genotóxico de la DhL inducido en linfocitos humanos. Los linfocitos fueron expuestos a DhL (5, 15, y 25μM). (A) Frecuencia de micronúcleos (MN) en células binucleadas. (B). Ensayo cometa. Como referencia, se utilizó linfocitos tratados con 1 μM mitomicina C (MMC) y 25 μ M H₂O₂ (barras cuadradas). Las pruebas estadísticas se limitaron a la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA de una vía. de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (n=18) (p <0,005, ** p <0,001, *** p <0,001).

El efecto genotóxico se determinó basándose en la frecuencia de micronúcleos, se observó que la DhL (a partir de 5 μM) aumentó la frecuencia de micronúcleos (Figura 23A). En el ensayo del cometa, los linfocitos fueron expuestos a diferentes

concentraciones de DhL por 3 h y se midió el largo de cola en el ensayo del cometa (Figura 23B). Para este ensayo, se observó que la exposición de los linfocitos a la DhL aumentó estadísticamente la migración de la cola del cometa a partir de 25 μ M (Figura 23B).

Este estudio respalda el uso de la DhL, obtenida de *G. verrucosa* que crece en algunas áreas del sur de Ecuador, ya que muestra su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro*. De las cuatro líneas celulares tumorales ensayadas, se observó que la más sensible a la exposición de DhL fue la línea celular astrocitoma D384. Se encontró que tanto el extracto de *G. verrucosa* y la DhL afectan negativamente la supervivencia de las células D384 *in vitro*. Se ha demostrado que la DhL podría inducir tanto la detención del ciclo celular y la apoptosis de células de astrocitoma D384 dependiendo de la dosis utilizada. Se observó además que DhL era citotóxica para las células tumorales D384 en las dosis que no son perjudiciales para los linfocitos humanos normales. A dosis relativamente bajas, la DhL indujo un efecto citostático, similar a lo reportado para otras lactonas sesquiterpénicas, tales como la parthenolida, deoxielefantopina, isodeoxielefantopina y costunolida [351][168][352]. Este efecto también fue consistente con los efectos antiproliferativos reportados para la DhL y 11,13-dihidro-dehidroleucodina en las células del músculo liso vascular y la dehidroparisina-B en células de melanoma B16 [353][354]. En dosis altas, el efecto apoptótico de la DhL en células D384 se encontró similar al observado en las células MCF-7 de cáncer de mama y las células HeLa de cáncer cervical uterino [355].

Los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular y la apoptosis están estrechamente relacionados, de manera que un número de proteínas que controlan la progresión del ciclo celular también pueden inducir apoptosis en condiciones en las que la progresión del ciclo celular no se desarrolla adecuadamente [356][357]. Por lo tanto se observó que el fenotipo de la muerte celular inducida por la DhL está asociado con el aumento de la expresión del factor de transcripción p73, activador de la proteína apoptótica BAX y el inhibidor del ciclo celular CDKN1A (p21), y con el aumento de la fosforilación de p53 y p73 en los residuos de aminoácidos S46 y Y99, respectivamente.

Las últimas observaciones de modificaciones post-traduccionales específicas de p53 y p73 en las células tras la exposición de la DhL en las células D384 refuerzan la idea de que DhL induce a la maquinaria apoptótica ya que estos eventos de fosforilación se asocian a menudo con las actividades pro-apoptóticas de p53 y p73 [358]. c-ABL fosforila a TAp73 α en Y99 tirosina, que es un paso necesario para la actividad pro-apoptótica de p73 y su capacidad para activar transcripcionalmente BAX, que posteriormente conducen a la traslocación de BAX a la mitocondria para inducir la liberación de citocromo c de la mitocondria [290]. La fosforilación de S46 en p53 está implicada en la selectividad de los genes diana apoptóticos sensibles a p53 [359][360].

Muchos fármacos quimioterapéuticos inducen la expresión de p73, que a su vez aumentan la apoptosis inducida por fármacos utilizados en la quimioterapia como doxorubicina y cisplatino [290]. El fenotipo de la muerte de las células tumorales D-384 inducida por la DhL en gran medida podría estar relacionado con daños en el ADN, como lo demuestran los micronúcleos y el ensayo del cometa. El

aumento de la expresión de CDKN1A (p21) tras la exposición a la DhL también indica la detención del ciclo celular de las células D384, en el que la DhL podría inducir los mecanismos de reparación del ADN. Puesto que en una alteración de la maquinaria de reparación del ADN, las células tumorales se ven obligados a entrar en el proceso de la muerte celular apoptótica como se evidencia por el aumento de la expresión de BAX.

5 DISCUSIÓN

De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población mundial depende de la medicina alternativa tradicional y de derivados obtenidos de fuentes naturales para atender sus necesidades de atención primaria de la salud [361][362]. Las plantas medicinales tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer y más del 60% de los fármacos contra el cáncer que se usan en la actualidad provienen de las fuentes naturales de directa o indirectamente [173]. El descubrimiento de fármacos a partir de fuentes naturales, resultó en el desarrollo de múltiples agentes anti-cáncer en base de plantas (vincristina, vinblastina, etopósido, paclitaxel, camptotecina, topotecán e irinotecán), de organismos marinos (citarabina, aplidina y dolastatina) y microorganismos (dactinomicina, bleomicina y doxorubicina) [363–365]. Además, existen otros fitometabolitos que se pueden utilizar en la terapia anticáncer aislados a partir de frutas y verduras, estos agentes incluyen la curcumina (cúrcuma), el resveratrol (uvas rojas, cacahuetes y bayas), la genisteína, la alicina (ajo), el licopeno (tomate), la capsaicina (chile rojo), diosgenina (alholva), 6-gingerol (jengibre), ácido elágico (granada), el ácido ursólico (manzana, peras, ciruelas), la silimarina (cardo mariano), anetol (anís, alcanfor y el hinojo), catequinas (verde té), eugenol (clavo de olor), indol-3-carbinol (crucíferas) y limoneno (cítricos) [366][367]. La búsqueda de medicamentos contra el cáncer se ha regido por el hecho de que las células tumorales se replican más rápidamente

que las células normales, y la gran mayoría de los fármacos utilizados actualmente causan daños en el ADN, interrumpiendo la división celular y causando posteriormente la muerte celular. Recientemente, el descubrimiento de nuevas dianas moleculares alteradas en las células tumorales permite ampliar el desarrollo de compuestos anti-cáncer novedosos con actividad farmacológica más específica. La evidencia acumulada sugiere que los metabolitos secundarios bioactivos con efectos tóxicos menores están ampliamente disponibles en los hábitats naturales de muchos países, especialmente en flora amazónica de América del Sur. Estos metabolitos secundarios obtenidos de plantas, hongos y organismos marinos han demostrado que modulan múltiples dianas moleculares y afectan a un número de vías de señalización y de regulación que en última instancia conducen a la muerte de las células tumorales a través de la detención del ciclo celular, apoptosis o necrosis. Varios metabolitos secundarios, son capaces de afectar a los factores de transcripción, los mecanismos de regulación epigenética, vía mTOR, componentes moleculares de la apoptosis intrínseca y extrínseca, la regulación del ciclo celular, la activación del receptor dependiente del ligando, y las vías de estrés oxidativo. Muchos metabolitos secundarios potencialmente alteran la expresión de genes supresores de tumores, genes clave promotores de tumores y oncogenes a través de la modulación de la metilación del ADN y la modificación de la cromatina en el cáncer, así como otros reguladores transcripcionales que podrían conducir a la detención del ciclo celular, apoptosis, necroptosis, autofagia y cambios metabólicos.

Los metabolitos secundarios son funcionalmente pleiotrópicos; muestran claramente que pueden afectar a múltiples dianas intracelulares, y diferentes

procesos de señalización celular, por lo general alterados en las células cancerosas, con una toxicidad limitada en las células normales. La orientación simultánea de múltiples vías puede ayudar a eliminar a las células cancerosas y la aparición de resistencia lenta del fármaco. Además, la combinación de fitoquímicos purificados o sus análogos sintéticos con quimioterapia o radioterapia puede aprovechar sus efectos sinérgicos, obteniendo una reducción de la toxicidad. Las combinaciones de los agentes citotóxicos y de fitometabolitos que modulan el ciclo celular antitumorales citotóxicos, induce a la muerte celular y alteran el metabolismo celular potencialmente podrían desempeñar un papel más importante en la activación de los mecanismos moleculares que inhiben el crecimiento del tumor.

6 CONCLUSIONES

En este estudio se estableció que los diversos extractos orgánicos de la fruta de *Anona montana* M muestran la capacidad de inhibir la supervivencia de células tumorales de diferentes líneas celulares de cáncer humano de próstata, cáncer de mama, astrocitoma, cáncer de pulmón y cáncer de colon, siendo el más activo el extracto de acetato de etilo de *A. montana*. Los extractos de *A. montana* también son capaces de inducir daño en el ADN en las células normales que se muestran por el ensayo cometa.

De los extractos de hojas de *Clusia latipes*, el extracto con mayor potencial citotóxico fue el extracto de acetato de etilo. Se aislaron cuatro metabolitos secundarios: friedelina, friedolan 3-ol, hesperidina y β -amirina. Los compuestos fitoquímicos aislados están relacionados con la actividad etnomédica reportada para la especie. Sin embargo el extracto hexánico aumentó el daño en el ADN en los linfocitos expuestos a las concentraciones de 25, 35 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

El extracto de hojas de *G. verrucosa* y la Dehidroleucodina inhiben el crecimiento de las líneas tumorales, en particular de células de astrocitoma D384 mediante la activación de la detención del ciclo celular y la apoptosis a través del mecanismo de p73-dependiente. El principio activo, DhL, demostró que exhibía actividades tanto citostáticas y citotóxicas en células D384 de una manera dependiente de la dosis, así como los efectos genotóxicos. Los eventos moleculares subyacentes a estos efectos incluyen, pero no se limitan a p73, p-p73, p-p53, CDKN1A, y las vías de BAX-dependientes.

7 PERSPECTIVAS

El presente estudio mostró resultados prometedores con respecto al potencial del extracto de *A. montana* en el tratamiento de las células cancerosas, sin embargo, los estudios futuros necesarios para sacar provecho de estos hallazgos deben centrarse en la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos que conducen al daño del ADN y la muerte de las células.

En caso de *Clusia latipes* se necesitan estudios adicionales para corroborar los efectos citotóxicos y genotóxicos de esta mezcla de metabolitos secundarios presentes en el extracto de hojas y proporcionar una base mecánica molecular de estos efectos previos a un posible uso de estos extractos como posibles aplicaciones biomédicas antineoplásicas.

Estos resultados apoyan la noción de que el extracto metanólico de hojas de *G. verrucosa* y la dehidroleucodina, tienen potencial citotóxico en especial en células de astrocitoma D384 mediante la activación de la detención del ciclo celular y la apoptosis a través de mecanismo de p73-dependiente. Se necesitan estudios más profundos para identificar otros numerosos actores involucrados en estos efectos para entender completamente las rutas moleculares que subyacen a la respuesta de las células tumorales al exponerlas a Dehidroleucodina.

Es claro que en Ecuador existe una gran variedad de especies vegetales que deriva en una mayor diversidad química presente, así mismo son pocos los estudios que han demostrado el gran potencial de uso contra el cáncer de las especies vegetales utilizadas tradicionalmente por diversas etnias no solo ecuatorianas; este trabajo sustenta la información de algunas especies

vegetales, al que sin embargo es necesario profundizar con estudios en la fase preclínica de las moléculas aisladas y que hasta ahora presentan actividad promisoría en estudios *in vitro* y en algunos casos en modelos animales.

8 REFERENCIAS

- [1] I. Collins, P. Workman, New approaches to molecular cancer therapeutics., *Nat. Chem. Biol.* 2 (2006) 689–700.
- [2] A. Eastman, R. Perez, New targets and challenges in the molecular therapeutics of cancer, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 62 (2006) 5–14.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell.* 100 (2000) 57–70.
- [4] D. Hanahan, R. a Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation., *Cell.* 144 (2011) 646–74.
- [5] J.A. Engelman, Targeting PI3K signalling in cancer : opportunities , challenges and limitations, *Cancer.* 9 (2009).
- [6] C. Nardella, A. Carracedo, A. Alimonti, R.M. Hobbs, J.G. Clohessy, Z. Chen, et al., Differential requirement of mTOR in postmitotic tissues and tumorigenesis., *Sci. Signal.* 2 (2009) ra2.
- [7] S.-M. Maira, F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, et al., Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity., *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 1851–63.
- [8] Y.Y. Zaytseva, J.D. Valentino, P. Gulhati, B.M. Evers, mTOR inhibitors in cancer therapy., *Cancer Lett.* 319 (2012) 1–7.
- [9] S. Pyndiah, S. Tanida, K.M. Ahmed, E.K. Cassimere, C. Choe, D. Sakamuro, c-MYC suppresses BIN1 to release poly(ADP-ribose) polymerase 1: a mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance., *Sci. Signal.* 4 (2011) ra19.
- [10] L.-G. Larsson, M.A. Henriksson, The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy., *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 1429–37.
- [11] X. Lu, A. Pearson, J. Lunec, The MYCN oncoprotein as a drug development target, *Cancer Lett.* 197 (2003) 125–130.
- [12] M.O. Lee, S.Y. Han, S. Jiang, J.H. Park, S.J. Kim, Differential effects of retinoic acid on growth and apoptosis in human colon cancer cell lines associated with the induction of retinoic acid receptor beta., *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 485–96.
- [13] S. a Sarkar, R.P. Sharma, Expression of c-Myc and other apoptosis-related genes in Swiss Webster mouse fetuses after maternal exposure to all trans-retinoic acid., *Reprod. Toxicol.* 16 (2002) 245–52.
- [14] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W.B. Smith, E.M. Morse, et al., Selective inhibition of BET bromodomains, *Nature.* 468 (2010) 1067–1073.
- [15] J.E. Delmore, G.C. Issa, M.E. Lemieux, P.B. Rahl, J. Shi, H.M. Jacobs, et al., BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc, *Cell.* 146 (2011) 904–917.

- [16] J. Zuber, J. Shi, E. Wang, A.R. Rappaport, H. Herrmann, E. a. Sison, et al., RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia, *Nature*. 478 (2011) 524–528.
- [17] C.J. Sherr, Cancer cell cycles., *Science* (80-.). 274 (1996) 1672–7.
- [18] K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer., *Cell Prolif.* 36 (2003) 131–49.
- [19] M. Malumbres, M. Barbacid, Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 153–66.
- [20] M. Classon, E. Harlow, The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer., *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 910–7.
- [21] S. Lapenna, A. Giordano, Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer., *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 547–66.
- [22] I. Collins, M.D. Garrett, Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2005) 366–73.
- [23] J. a Woyach, G. Lozanski, a S. Ruppert, A. Lozanski, K. a Blum, J. a Jones, et al., Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features., *Leukemia.* 26 (2012) 1442–1444.
- [24] D. Cirillo, F. Pentimalli, A. Giordano, Peptides or Small Molecules? Different Approaches to Develop More Effective CDK Inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 2854–2866.
- [25] G. Kroemer, Cell death and cancer: an introduction, *Oncogene.* 23 (2004) 2744–2745.
- [26] C.B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* (80-.). 267 (1995) 1456–1462.
- [27] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [28] S.W. Fesik, Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 876–85.
- [29] M. Nagane, H.J. Huang, W.K. Cavenee, The potential of TRAIL for cancer chemotherapy., *Apoptosis.* 6 (2001) 191–7.
- [30] P. a Holoch, T.S. Griffith, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies., *Eur. J. Pharmacol.* 625 (2009) 63–72.
- [31] I. Ghobrial, T. Witzig, A. Adjei, Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA. Cancer J. Clin.* 55 (2005) 178–194.

- [32] C.M. van Geelen, B. Pennarun, P.T. Le, E.G. de Vries, S. de Jong, Modulation of TRAIL resistance in colon carcinoma cells: different contributions of DR4 and DR5., *BMC Cancer*. 11 (2011) 39.
- [33] M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis., *Nature*. 407 (2000) 770–6.
- [34] D. Menendez, A. Inga, M.A. Resnick, The expanding universe of p53 targets., *Nat. Rev. Cancer*. 9 (2009) 724–737.
- [35] K.G. Wiman, Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer, *Cell Death Differ*. 13 (2006) 921–926.
- [36] P. Lu, X. Yang, Y. Huang, Z. Lu, Z. Miao, Q. Liang, et al., Antitumor activity of a combination of rAd2p53 adenoviral gene therapy and radiotherapy in esophageal carcinoma., *Cell Biochem. Biophys*. 59 (2011) 147–52.
- [37] M. Partridge, D.E. Costea, X. Huang, The changing face of p53 in head and neck cancer., *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 36 (2007) 1123–38.
- [38] C. Tovar, J. Rosinski, Z. Filipovic, From the cover: small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy, *Med. Sci*. 103 (2006) 188–1893.
- [39] U. Fischer, K. Schulze-Osthoff, Apoptosis-based therapies and drug targets., *Cell Death Differ*. 12 Suppl 1 (2005) 942–61.
- [40] J.C. Reed, M. Pellecchia, Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies., *Blood*. 106 (2005) 408–18.
- [41] L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, et al., In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2., *Science* (80-.). 303 (2004) 844–8.
- [42] A.G. Letai, Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis., *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 121–32.
- [43] J.C. Reed, Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities., *Cell Death Differ*. 13 (2006) 1378–86.
- [44] G. Lessene, P.E. Czabotar, P.M. Colman, BCL-2 family antagonists for cancer therapy., *Nat. Rev. Drug Discov*. 7 (2008) 989–1000.
- [45] N.N. Danial, BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death., *Clin. Cancer Res*. 13 (2007) 7254–63.
- [46] M.H. Kang, C.P. Reynolds, Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy argeting Mitochondrial Apoptotic Pathways, *Clin. Cancer Res*. (2009) 1126–1132.
- [47] C.L. Hann, V.C. Daniel, E. a Sugar, I. Dobromilskaya, S.C. Murphy, L. Cope, et al., Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer., *Cancer Res*. 68 (2008) 2321–8.

- [48] A.F. Kabore, J.B. Johnston, S.B. Gibson, Changes in the apoptotic and survival signaling in cancer cells and their potential therapeutic implications., *Curr. Cancer Drug Targets*. 4 (2004) 147–63.
- [49] M. D'Amelio, E. Tino, F. Cecconi, The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design., *Pharm. Res.* 25 (2008) 740–51.
- [50] J.-Y. Yang, D. Michod, J. Walicki, C. Widmann, Surviving the kiss of death., *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1027–31.
- [51] D.C. Altieri, Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery., *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 61–70.
- [52] B.M. Ryan, N. O'Donovan, M.J. Duffy, Survivin: a new target for anti-cancer therapy., *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 553–62.
- [53] D.N. Church, D.C. Talbot, Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors., *Curr. Oncol. Rep.* 14 (2012) 120–8.
- [54] D.C. Altieri, Targeting survivin in cancer., *Cancer Lett.* 332 (2013) 225–8.
- [55] R. Arora, M. Shuda, A. Guastafierro, H. Feng, T. Toptan, Y. Tolstov, et al., Survivin is a therapeutic target in Merkel cell carcinoma., *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 133ra56.
- [56] L. Hayflick, The Strategy of Senescence , *Gerontol.* . 14 (1974) 37–45.
- [57] A.G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. Holt, C. Chiu, G. Morin, et al., Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells, *Science* (80-.). 279 (1998) 349–352.
- [58] L. Guittat, P. Alberti, D. Gomez, A. De Cian, G. Pennarun, T. Lemarteleur, et al., Targeting human telomerase for cancer therapeutics., *Cytotechnology*. 45 (2004) 75–90.
- [59] C.B. Harley, Telomerase and cancer therapeutics., *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 167–79.
- [60] M.W. Djojotubroto, A.C. Chin, N. Go, S. Schaezlein, M.P. Manns, S. Gryaznov, et al., Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma., *Hepatology*. 42 (2005) 1127–36.
- [61] G.C. Gellert, Z.G. Dikmen, W.E. Wright, S. Gryaznov, J.W. Shay, Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer., *Breast Cancer Res. Treat.* 96 (2006) 73–81.
- [62] J.W. Shay, W.N. Keith, Targeting telomerase for cancer therapeutics., *Br. J. Cancer*. 98 (2008) 677–83.
- [63] L. Weiner, R. Surana, S. Wang, Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 317–327.
- [64] M. Ruden, N. Puri, Novel anticancer therapeutics targeting telomerase., *Cancer Treat. Rev.* 5 (2012) 444–456.

- [65] B.-S. Herbert, Disruption of telomere homeostasis as a new cancer treatment strategy, *Memo - Mag. Eur. Med. Oncol.* 2 (2009) 21–24.
- [66] M.L. Bochman, K. Paeschke, V. a Zakian, DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures., *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 770–80.
- [67] M.-Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-ya, K. Wierzba, L.H. Hurley, Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2098–2099.
- [68] A. Agrawal, S. Dang, R. Gabrani, Recent patents on anti-telomerase cancer therapy., *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 7 (2012) 102–17.
- [69] S. Balasubramanian, L.H. Hurley, S. Neidle, Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 261–75.
- [70] A.M. Burger, F. Dai, C.M. Schultes, A.P. Reszka, M.J. Moore, J. a Double, et al., The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function., *Cancer Res.* 65 (2005) 1489–96.
- [71] C. Leonetti, M. Scarsella, G. Riggio, A. Rizzo, E. Salvati, M. D'Incalci, et al., G-quadruplex ligand RHPS4 potentiates the antitumor activity of camptothecins in preclinical models of solid tumors., *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 7284–91.
- [72] Y. Chen, K. Qu, C. Zhao, L. Wu, J. Ren, J. Wang, et al., Insights into the biomedical effects of carboxylated single-wall carbon nanotubes on telomerase and telomeres., *Nat. Commun.* 3 (2012) 1074.
- [73] D.X. Nguyen, P.D. Bos, J. Massagué, Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 274–84.
- [74] P.S. Steeg, Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 55–63.
- [75] D. Palmieri, D.O. Halverson, T. Ouatas, C.E. Horak, M. Salerno, J. Johnson, et al., Medroxyprogesterone acetate elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor expression in hormone receptor-negative breast cancer., *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 632–42.
- [76] S.C. Smith, D. Theodorescu, Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 253–64.
- [77] L. El Touny, P. Banerjee, Genistein induces the metastasis suppressor kangai-1 which mediates its anti-invasive effects in TRAMP cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361 (2007) 169–175.
- [78] J.-H. Xu, X.-Z. Guo, L.-N. Ren, L.-C. Shao, M.-P. Liu, KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells., *World J. Gastroenterol.* 14 (2008) 1126–32.
- [79] V. Stresing, F. Daubiné, I. Benzaid, H. Mönkkönen, P. Clézardin, Bisphosphonates in cancer therapy., *Cancer Lett.* 257 (2007) 16–35.

- [80] M.A. Matos, U. Tannuri, R. Guarniero, The effect of zoledronate during bone healing., *J. Orthop. Traumatol.* 11 (2010) 7–12.
- [81] L. Wu, L. Zhu, W.-H. Shi, J. Zhang, D. Ma, B. Yu, Zoledronate inhibits the proliferation, adhesion and migration of vascular smooth muscle cells., *Eur. J. Pharmacol.* 602 (2009) 124–31.
- [82] N.E. Hynes, H. a Lane, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 341–54.
- [83] J. Mendelsohn, J. Baselga, The EGF receptor family as targets for cancer therapy., *Oncogene.* 19 (2000) 6550–65.
- [84] B. Weigelt, J.L. Peterse, L.J. van 't Veer, Breast cancer metastasis: markers and models., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 591–602.
- [85] J. Baselga, S.M. Swain, Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 463–75.
- [86] R.A. Weinberg, Perspectives in Cancer Research Oncogenes , Antioncogenes , and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis, *Cancer Res.* 49 (1989) 3713–3721.
- [87] B. Baguley, Antivascular therapy of cancer: DMXAA., *Lancet Oncol.* 4 (2003) 141–148.
- [88] R. Kerbel, J. Folkman, Clinical translation of angiogenesis inhibitors., *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 727–39.
- [89] S.J. Harper, D.O. Bates, VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?, *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 880–7.
- [90] A. Grothey, E. Galanis, Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules., *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6 (2009) 507–18.
- [91] S. Wilhelm, C. Carter, M. Lynch, T. Lowinger, J. Dumas, R. a Smith, et al., Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer., *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 835–44.
- [92] R. Ronca, S. Sozzani, M. Presta, P. Alessi, Delivering cytokines at tumor site: The immunocytokine-conjugated anti-EDB-fibronectin antibody case, *Immunobiology.* 214 (2009) 800–810.
- [93] D. Neri, R. Bicknell, Tumour vascular targeting., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 436–46.
- [94] V.L. Heath, R. Bicknell, Anticancer strategies involving the vasculature., *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6 (2009) 395–404.
- [95] A. Reinacher-Schick, M. Pohl, W. Schmiegel, Drug insight: antiangiogenic therapies for gastrointestinal cancers--focus on monoclonal antibodies., *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (2008) 250–67.
- [96] G.M. Cragg, D.J. Newman, Nature: a vital source of leads for anticancer drug development, *Phytochem. Rev.* 8 (2009) 313–331.

- [97] N. Ferrara, R.S. Kerbel, Angiogenesis as a therapeutic target., *Nature*. 438 (2005) 967–74.
- [98] J. a Legg, J.M.J. Herbert, P. Clissold, R. Bicknell, Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration., *Angiogenesis*. 11 (2008) 13–21.
- [99] A.W. Koch, T. Mathivet, B. Larrivé, R.K. Tong, J. Kowalski, L. Pibouin-Fragner, et al., Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B., *Dev. Cell*. 20 (2011) 33–46.
- [100] S. Negrini, V.G. Gorgoulis, T.D. Halazonetis, Genomic instability--an evolving hallmark of cancer., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 11 (2010) 220–8.
- [101] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control, *Nat. Med*. 10 (2004) 789–799.
- [102] L.M. Guaman-Ortiz, V. Giansanti, F. Dona, I. Scovassi, Pharmacological Effects of PARP Inhibitors on Cancer and other Diseases, *Curr. Enzym. Inhib*. 7 (2011) 244–258.
- [103] H. Niida, M. Nakanishi, DNA damage checkpoints in mammals., *Mutagenesis*. 21 (2006) 3–9.
- [104] S. Matsuoka, B. a Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, K.E. Hurov, J. Luo, et al., ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage., *Science*. 316 (2007) 1160–6.
- [105] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R. a Sharma, DNA repair pathways as targets for cancer therapy., *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 193–204.
- [106] D. Yang, M. Halaby, Y. Li, J.C. Hibma, P. Burn, Cytoplasmic ATM protein kinase : an emerging therapeutic target for diabetes , cancer and neuronal degeneration, *Drug Discov. Today*. 16 (2011) 332–338.
- [107] A. Nadkarni, M. Shrivastav, A.C. Mladek, P.M. Schwingler, P.T. Grogan, J. Chen, et al., ATM inhibitor KU-55933 increases the TMZ responsiveness of only inherently TMZ sensitive GBM cells., *J. Neurooncol*. (2012).
- [108] M. Rainey, M. Charlton, R. Stanton, M. Kastan, Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to Ionizing Radiation, *Cancer Res*. 68 (2008) 7466–7474.
- [109] A.C. Begg, F. a Stewart, C. Vens, Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs., *Nat. Rev. Cancer*. 11 (2011) 239–53.
- [110] K. Fukasawa, Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes., *Nat. Rev. Cancer*. 7 (2007) 911–24.
- [111] G.J.P.L. Kops, B. a a Weaver, D.W. Cleveland, On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint., *Nat. Rev. Cancer*. 5 (2005) 773–85.
- [112] B. Zhivotovsky, G. Kroemer, Apoptosis and genomic instability., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 5 (2004) 752–62.

- [113] O. Gautschi, J. Heighway, P.C. Mack, P.R. Purnell, P.N. Lara, D.R. Gandara, Aurora kinases as anticancer drug targets., *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1639–1648.
- [114] J.J.E.M. Kitzen, M.J. a de Jonge, J. Verweij, Aurora kinase inhibitors., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 73 (2010) 99–110.
- [115] E. a Harrington, D. Bebbington, J. Moore, R.K. Rasmussen, A.O. Ajose-Adeogun, T. Nakayama, et al., VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo., *Nat. Med.* 10 (2004) 262–7.
- [116] N. Keen, S. Taylor, Mitotic drivers--inhibitors of the Aurora B Kinase., *Cancer Metastasis Rev.* 28 (2009) 185–95.
- [117] T. Fiaschi, P. Chiarugi, Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison., *Int. J. Cell Biol.* 2012 (2012) 762825.
- [118] D.C. Wallace, Mitochondria and cancer., *Nat. Rev. Cancer.* 12 (2012) 685–98.
- [119] R.L. Aft, F.W. Zhang, D. Gius, Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death., *Br. J. Cancer.* 87 (2002) 805–12.
- [120] S. Fulda, L. Galluzzi, G. Kroemer, Targeting mitochondria for cancer therapy., *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 447–64.
- [121] S.P. Mathupala, Y.H. Ko, P.L. Pedersen, Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy., *Semin. Cancer Biol.* 19 (2009) 17–24.
- [122] S. Cohen, E. Flescher, Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug, *Phytochemistry.* 70 (2009) 1600–1609.
- [123] Z. Raviv, S. Cohen, D. Reischer-Pelech, The anti-cancer activities of jasmonates., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71 (2013) 275–85.
- [124] M. Vander Heiden, H. Christofk, E. Schuma, A.O. Subtelny, H. Sharfi, E. Harlow, et al., Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1118–1124.
- [125] M.S. Goldberg, P. a Sharp, Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression., *J. Exp. Med.* 209 (2012) 217–24.
- [126] J. Chen, J. Xie, Z. Jiang, B. Wang, Y. Wang, X. Hu, Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2., *Oncogene.* 30 (2011) 4297–4306.
- [127] M.A. Iqbal, R.N.K. Bamezai, Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin, *PLoS One.* 7 (2012) e36764.
- [128] R.A. Cairns, I.S. Harris, T.W. Mak, Regulation of cancer cell metabolism., *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 85–95.

- [129] C. V Dang, M. Hamaker, P. Sun, A. Le, P. Gao, Therapeutic targeting of cancer cell metabolism., *J. Mol. Med.* 89 (2011) 205–212.
- [130] A. Le, C.R. Cooper, A.M. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L.M. Deck, et al., Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 2037–42.
- [131] J.N. Blattman, P.D. Greenberg, Cancer immunotherapy: a treatment for the masses., *Science.* 305 (2004) 200–5.
- [132] S. V Sharma, J. Settleman, Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and “oncogenic shock”., *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 666–73.
- [133] M. Dougan, G. Dranoff, Immune therapy for cancer., *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 83–117.
- [134] A.J. Muller, P.A. Scherle, Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors., *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 613–625.
- [135] J.B. Katz, A.J. Muller, G.C. Prendergast, T-cell tolerance and tumoral immune escape, *Immunol. Rev.* 2008. 222 (2008) 206–221.
- [136] G.C. Prendergast, Immune escape as a fundamental trait of cancer : focus on IDO, *Oncogene.* 27 (2008) 3889–3900.
- [137] M. Vanneman, G. Dranoff, Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment., *Nat. Rev. Cancer.* 12 (2012) 237–51.
- [138] J. Yared, A. Kimball, M.R. Baer, H. Bahrain, M. Auerbach, Rituximab maintenance therapy until progression after rituximab and chemotherapy induction in patients with follicular lymphoma., *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* 13 (2013) 253–7.
- [139] L.M. Weiner, R. Surana, S. Wang, Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy., *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 317–27.
- [140] A.E. Moran, M. Kovacsovics-Bankowski, A.D. Weinberg, The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy, *Curr. Opin. Immunol.* (2013) 1–8.
- [141] R. Advani, A. Forero-Torres, R.R. Furman, J.D. Rosenblatt, A. Younes, H. Ren, et al., Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin’s lymphoma., *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 4371–7.
- [142] R. Houot, H. Kohrt, M.J. Goldstein, R. Levy, Immunomodulating antibodies and drugs for the treatment of hematological malignancies., *Cancer Metastasis Rev.* 30 (2011) 97–109.
- [143] K.S. Peggs, S. a Quezada, C. a Chambers, A.J. Korman, J.P. Allison, Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies., *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1717–25.
- [144] S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin, Immunity, inflammation, and cancer., *Cell.* 140 (2010) 883–99.

- [145] B. Fried, A. Reddy, D. Mayer, Helminths in human carcinogenesis., *Cancer Lett.* 305 (2011) 239–49.
- [146] B.B. Aggarwal, R. V Vijayalekshmi, B. Sung, Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe., *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 425–30.
- [147] J. Kundu, Y. Surh, Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals., *Mutat. Res.* 591 (2005) 123–146.
- [148] C.N. Serhan, N. Chiang, T.E. Van Dyke, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 349–61.
- [149] E.R. Greene, S. Huang, C.N. Serhan, D. Panigrahy, Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96 (2011) 27–36.
- [150] D. Wang, R.N. Dubois, Eicosanoids and cancer., *Nat. Rev. Cancer.* 10 (2010) 181–93.
- [151] J. Cuzick, F. Otto, J. a Baron, P.H. Brown, J. Burn, P. Greenwald, et al., Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement., *Lancet Oncol.* 10 (2009) 501–7.
- [152] A. Ben-Baruh, Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators., *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 38–52.
- [153] J.-L. Galzi, M. Hachet-Haas, D. Bonnet, F. Daubeuf, S. Lecat, M. Hibert, et al., Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications., *Pharmacol. Ther.* 126 (2010) 39–55.
- [154] T. Trotta, S. Costantini, G. Colonna, Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: putative target for new drug design., *Mol. Immunol.* 47 (2009) 332–9.
- [155] F. Balkwill, Tumour necrosis factor and cancer., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 361–71.
- [156] I. Zidi, S. Mestiri, A. Bartegi, N. Ben Amor, TNF-alpha and its inhibitors in cancer., *Med. Oncol.* 27 (2010) 185–98.
- [157] F. Balkwill, A. Mantovani, Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics., *Clin. Pharmacol. Ther.* 87 (2010) 401–6.
- [158] E.R. Brown, K. a Charles, S. a Hoare, R.L. Rye, D.I. Jodrell, R.E. Aird, et al., A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer., *Ann. Oncol.* 19 (2008) 1340–6.
- [159] Y. Lin, L. Bai, W. Chen, S. Xu, The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy, *Expert Opin. Ther. Targets.* 14 (2010) 45–55.

- [160] S.I. Grivennikov, M. Karin, Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) i104–i108.
- [161] Y. Guo, F. Xu, T. Lu, Z. Duan, Z. Zhang, Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer., *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 904–10.
- [162] H.-M. Shen, V. Tergaonkar, NF κ B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy, *Apoptosis.* 14 (2009) 348–363.
- [163] S. Olivier, P. Robe, V. Bours, Can NF- κ B be a target for novel and efficient anti-cancer agents ?, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1054–1068.
- [164] C. Nakanishi, M. Toi, Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 297–309.
- [165] L.M. Coussens, L. Zitvogel, a. K. Palucka, Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet?, *Science (80-.)*. 339 (2013) 286–291.
- [166] A.E. Place, N. Suh, C.R. Williams, R. Risingsong, T. Honda, Y. Honda, et al., The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo., *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 2798–806.
- [167] A. Petronelli, G. Pannitteri, U. Testa, Triterpenoids as new promising anticancer drugs., *Anticancer Drugs.* 20 (2009) 880–892.
- [168] a. Salminen, M. Lehtonen, T. Suuronen, K. Kaarniranta, J. Huuskonen, Terpenoids: Natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2979–2999.
- [169] J. Shortt, a K. Hsu, R.W. Johnstone, Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy., *Oncogene.* (2013) 1–12.
- [170] A. Emadi, S.D. Gore, Arsenic trioxide - An old drug rediscovered., *Blood Rev.* 24 (2010) 191–9.
- [171] R. Weissleder, M.J. Pittet, Imaging in the era of molecular oncology., *Nature.* 452 (2008) 580–9.
- [172] G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman, Impact of natural products on developing new anti-cancer agents., *Chem. Rev.* 109 (2009) 3012–43.
- [173] G.M. Cragg, D.J. Newman, Natural products: a continuing source of novel drug leads., *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 3670–95.
- [174] M. Gupta, Natural Products Research in Latin America, *Pharm. Biol.* 39 (2001) 80–91.
- [175] L.N. Joppa, P. Visconti, C.N. Jenkins, S.L. Pimm, Achieving the convention on biological diversity's goals for plant conservation., *Science.* 341 (2013) 1100–3.
- [176] M.J. Balunas, W.P. Jones, Y.W. Chin, Q. Mi, N.R. Farnsworth, D.D. Soejarto, et al., Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project., *Chem. Biodivers.* 3 (2006) 897–915.

- [177] V. Tene, O. Malagon, P.V. Finzi, G. Vidari, C. Armijos, T. Zaragoza, An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador, *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 63–81.
- [178] C.E. Cerón, Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos, *Botánica Económica Los Andes Cent.* (2006) 285–293.
- [179] J.G. Graham, M.L. Quinn, D.S. Fabricant, N.R. Farnsworth, Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell., *J. Ethnopharmacol.* 73 (2000) 347–77.
- [180] H. El-Seedi, A. Hazell, K. Torssell, Triterpenes, Lichexanthone And An Acetylenic Acid From *Minuartia Guianensis*, *Phytochemistry.* 35 (1994) 1297–1299.
- [181] L. de la Torre, H. Navarrete, M.-P. Muriel, M. Macía, H. Balslev, Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador, Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, Quito, Aarhus, 2008.
- [182] P. Pohle, S. Reinhardt, Indigenous knowledge of plants and their utilization among the Shuar of the lower tropical mountain forest in southern Ecuador, *Lyonia.* 7 (2004) 133–149.
- [183] G. Bourdy, S.J. DeWalt, L.R. Chávez de Michel, a Roca, E. Deharo, V. Muñoz, et al., Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group., *J. Ethnopharmacol.* 70 (2000) 87–109.
- [184] M.E. Heitzman, C.C. Neto, E. Winiarz, A.J. Vaisberg, G.B. Hammond, Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae)., *Phytochemistry.* 66 (2005) 5–29.
- [185] N. Bacher, M. Tiefenthaler, S. Sturm, H. Stuppner, M.J. Ausserlechner, Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells, *Br. J. Haematol.* 132 (2006) 615–622.
- [186] E. García Prado, M.D. García Gimenez, R. De la Puerta Vázquez, J.L. Espartero Sánchez, M.T. Sáenz Rodríguez, Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines., *Phytomedicine.* 14 (2007) 280–4.
- [187] B. Rinner, Z.X. Li, H. Haas, V. Siegl, S. Sturm, H. Stuppner, et al., Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells., *Anticancer Res.* 29 (2009) 4519–28.
- [188] Y. Sheng, R.W. Pero, H. Wagner, Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*., *Phytomedicine.* 7 (2000) 137–43.
- [189] A.C. Cheng, C.B. Jian, Y.T. Huang, C.S. Lai, P.C. Hsu, M.H. Pan, Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells., *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 2206–18.

- [190] R. Pilarski, C.M. Gurrola-Díaz, P.M. García-López, G. Soldevila, A. Olejnik, W. Grajek, et al., Enhanced proapoptotic response of the promyelocytic leukemia HL-60 cells treated with an *Uncaria tomentosa* alkaloid preparation, *J. Herb. Med.* (2013) 1–8.
- [191] L. De Martino, J.L.S. Martinot, S. Franceschelli, A. Leone, C. Pizza, V. De Feo, Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts., *J. Ethnopharmacol.* 107 (2006) 91–4.
- [192] R. Pilarski, B. Filip, J. Wietrzyk, M. Kuraś, K. Gulewicz, Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition., *Phytomedicine.* 17 (2010) 1133–9.
- [193] C.M. Gurrola-Díaz, P.M. García-López, K. Gulewicz, R. Pilarski, S. Dihlmann, Inhibitory mechanisms of two *Uncaria tomentosa* extracts affecting the Wnt-signaling pathway., *Phytomedicine.* 18 (2011) 683–90.
- [194] L. Allen-Hall, J.T. Arnason, P. Cano, R.M. Lafrenie, *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- α inhibitor through NF- κ B., *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 685–93.
- [195] A. Salatino, M. Salatino, G. Negri, Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae), *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2007) 11–33.
- [196] D. Gupta, B. Bleakley, R.K. Gupta, Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses., *J. Ethnopharmacol.* 115 (2008) 361–80.
- [197] D. Rossi, R. Bruni, N. Bianchi, C. Chiarabelli, R. Gambari, a Medici, et al., Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex., *Phytomedicine.* 10 (2003) 139–44.
- [198] M. Montopoli, R. Bertin, Z. Chen, J. Bolcato, L. Caparrotta, G. Frolidi, *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines., *J. Ethnopharmacol.* 144 (2012) 747–53.
- [199] Y. Cai, Z. Chen, J. Phillipson, Diterpenes from *Croton lechleri*, *Phytochemistry.* 32 (1993) 775–760.
- [200] J. Zhang, Y. Zhang, Y. Shan, N. Li, W. Ma, L. He, Synthesis and preliminary biological evaluation of novel taspine derivatives as anticancer agents., *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 2798–805.
- [201] Y. Zhan, Y. Zhang, C. Liu, J. Zhang, W.W. Smith, N. Wang, et al., A novel taspine derivative, HMQ1611, inhibits breast cancer cell growth via estrogen receptor α and EGF receptor signaling pathways., *Cancer Prev. Res. (Phila).* 5 (2012) 864–73.
- [202] S. Berger, P. Junior, L. Kopanski, Structural Revision Of Pregnane Ester Glycosides Cortex And New Compounds From *Condurango* Cortex And New Compounds., *Phytochemistry.* 27 (1988) 1451–1458.
- [203] K. Hayashi, K. Wada, H. Mitsuhasbhi, H. Bando, M. Takase, S. Terada, et al., Further investigation of Antitumor *Condurangoglycosides* with C-18 Oxygenated Aglycone, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 29 (1981) 2725–2730.

- [204] K. Hayashi, K. Wada, H. Mitsuhashi, H. Bando, M. Takase, S. Terada, et al., Antitumor active glycosides from Condurango Cortex, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 28 (1980) 1954–1958.
- [205] K. Bishayee, A. Paul, S. Ghosh, S. Sikdar, A. Mukherjee, R. Biswas, et al., Condurango-glycoside-A fraction of *Gonolobus condurango* induces DNA damage associated senescence and apoptosis via ROS-dependent p53 signalling pathway in HeLa cells., *Mol. Cell. Biochem.* (2013).
- [206] P. Banerji, D.R. Campbell, P. Banerji, Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homoeopathic medicine: a Best Case Series Program of the National Cancer Institute USA., *Oncol. Rep.* 20 (2008) 69–74.
- [207] B. Abegaz, M. Bezabeh, G. Alemayehu, H. Duddecck, Anthraquinones From *Senna Multz glandulosa*, *Phytochemistry*. 35 (1994) 465–468.
- [208] W. Yaoxian, Y. Hui, Z. Yunyan, L. Yanqin, G. Xin, W. Xiaoke, Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway., *Cancer Cell Int.* 13 (2013) 71.
- [209] G. Srinivas, R.J. Anto, P. Srinivas, S. Vidhyalakshmi, V.P. Senan, D. Karunagaran, Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9, *Eur. J. Pharmacol.* 473 (2003) 117–125.
- [210] C. Wang, X. Wu, M. Chen, W. Duan, L. Sun, M. Yan, et al., Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells., *Toxicology*. 231 (2007) 120–8.
- [211] C.X. Yu, X.Q. Zhang, L.D. Kang, P.J. Zhang, W.W. Chen, W.W. Liu, et al., Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP., *Asian J. Androl.* 10 (2008) 625–34.
- [212] L. Zhang, Y.K. Lau, L. Xi, R.L. Hong, D.S. Kim, C.F. Chen, et al., Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties., *Oncogene*. 16 (1998) 2855–63.
- [213] J.C. Ko, Y.J. Su, S.T. Lin, J.Y. Jhan, S.C. Ciou, C.M. Cheng, et al., Suppression of ERCC1 and Rad51 expression through ERK1/2 inactivation is essential in emodin-mediated cytotoxicity in human non-small cell lung cancer cells., *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 655–64.
- [214] H. Dave, L. Ledwani, A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications, *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 3 (2012) 291–319.
- [215] K. Qu, N. Shen, X. Xu, H. Su, J. Wei, M. Tai, et al., Emodin induces human T cell apoptosis in vitro by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction., *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (2013) 1217–28.
- [216] M. Afzal, I. Kazmi, R. Khan, R. Singh, M. Chauhan, T. Bisht, et al., *Bryophyllum pinnatum* : A review, *Int. J. Res. Biol. Sci.* 2 (2012) 143–149.

- [217] S. Innerhofer, K.-G. Bernhardt, Ethnobotanic garden design in the Ecuadorian Amazon, *Biodivers. Conserv.* 20 (2011) 429–439.
- [218] T. Yamagishi, M. Haruna, X.Z. Yan, Antitumor agents, 110, Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*, *J. Nat. Prod.* 5 (1989) 1071–1079.
- [219] U. Supratman, T. Fujiyama, K. Akiyama, H. Hayashi, Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* x *tubiflora*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 947–949.
- [220] S. Mahata, S. Maru, S. Shukla, A. Pandey, G. Mugesh, B.C. Das, et al., Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells., *BMC Complement. Altern. Med.* 12 (2012) 15.
- [221] A. Ito, B. Cui, D. Chávez, H. Chai, Cytotoxic Polyacetylenes from the Twigs of *Ochanostachys amentacea*, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 246–248.
- [222] V.M. Dembitsky, Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids., *Lipids.* 41 (2006) 883–924.
- [223] B.W. Gung, H. Dickson, Total synthesis of (-)-minquartynoic acid: an anti-cancer, anti-HIV natural product., *Org. Lett.* 4 (2002) 2517–9.
- [224] M.S. Gachet, J.S. Lecaro, M. Kaiser, R. Brun, H. Navarrete, R. a Muñoz, et al., Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis., *J. Ethnopharmacol.* 128 (2010) 184–97.
- [225] L.M. Cursino, A. Spirotto, S. Mesquita, D.W. De Oliveira, C.C. Fernandes, O. Libório, et al., Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), *Acta Amaz.* 39 (2009) 181–186.
- [226] N. Bailón-Moscoso, J.C. Romero-Benavides, P. Ostrosky-Wegman, Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells., *Tumour Biol.* 35 (2014) 3981–3995.
- [227] L. Lepore, N. Malafrente, F.B. Condero, M.J. Gualtieri, S. Abdo, F. Dal Piaz, et al., Isolation and structural characterization of glycosides from an anti-angiogenic extract of *Monnina obtusifolia* H.B.K., *Fitoterapia.* 82 (2011) 178–83.
- [228] W.S. Ferreira Júnior, M.P. Cruz, L.L. Dos Santos, M.F.T. Medeiros, Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): Plants for medicinal use from the 16th century to the present, *J. Herb. Med.* 2 (2012) 103–112.
- [229] B.I. Károlyi, S. Bösze, E. Orbán, P. Sohár, L. Drahos, E. Gál, et al., Acylated mono-, bis- and tris- cinchona-based amines containing ferrocene or organic residues: synthesis, structure and in vitro antitumor activity on selected human cancer cell lines., *Molecules.* 17 (2012) 2316–29.
- [230] V.R. Solomon, H. Lee, Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies., *Eur. J. Pharmacol.* 625 (2009) 220–33.

- [231] D. Baraniak, K. Kacprzak, L. Celewicz, Synthesis of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)--Cinchona alkaloid conjugates via click chemistry: Toward novel fluorescent markers and cytostatic agents., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 723–6.
- [232] E. Solary, I. Velay, B. Chauffert, J. Bidan, D. Caillot, M. Dumas, et al., Sufficient Levels of Quinine in the Serum Circumvent the Multidrug Resistance of the Human Leukemic Cell Line K562/ADM, *Cancer*. 68 (1991) 1714–1719.
- [233] P. Genne, M.T. Dimanche-Boitrel, R.Y. Mauvernay, G. Gutierrez, O. Duchamp, J.M. Petit, et al., Cinchonine, a potent efflux inhibitor to circumvent anthracycline resistance in vivo., *Cancer Res.* 52 (1992) 2797–801.
- [234] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters., *Nat. Rev. Cancer*. 2 (2002) 48–58.
- [235] C.C. Liaw, T.Y. Wu, F.R. Chang, Y.C. Wu, Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials., *Planta Med.* 76 (2010) 1390–404.
- [236] J.K. Rupprecht, Y.H. Hui, J.L. McLaughlin, Annonaceous acetogenins: a review., *J. Nat. Prod.* 53 (1990) 237–78.
- [237] M.C. Zafra-Polo, M.C. González, E. Estornell, S. Sahpaz, D. Cortes, Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I., *Phytochemistry*. 42 (1996) 253–71.
- [238] F.Q. Alali, X.X. Liu, J.L. Mclaughlin, Annonaceous acetogenins: recent progress., *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 504–40.
- [239] V.R. Fantin, P. Leder, Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy., *Oncogene*. 25 (2006) 4787–97.
- [240] C.J. Glover, A. a Rabow, Y.G. Isgor, R.H. Shoemaker, D.G. Covell, Data mining of NCI's anticancer screening database reveals mitochondrial complex I inhibitors cytotoxic to leukemia cell lines., *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 331–40.
- [241] H. Chiu, T. Chih, Y. Hsian, C. Tseng, Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2. 15, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 319–327.
- [242] X.F. Zhu, Z.C. Liu, B.F. Xie, Z.M. Li, G.K. Feng, H.H. Xie, et al., Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60., *Life Sci.* 70 (2002) 1259–69.
- [243] S.S.F. Yuan, H.L. Chang, H.W. Chen, F.C. Kuo, C.C. Liaw, J.H. Su, et al., Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways., *Life Sci.* 78 (2006) 869–74.
- [244] S. Derbré, R. Duval, G. Roué, A. Garofano, E. Poupon, U. Brandt, et al., Semisynthesis and screening of a small library of pro-apoptotic squamocin analogues: selection and study of a benzoquinone hybrid with an improved biological profile., *ChemMedChem*. 1 (2006) 118–29.

- [245] C.Y. Ragasa, G. Soriano, O.B. Torres, M.J. Don, C.C. Shen, Acetogenins from *Annona muricata*, *Pharmacogn. J.* 4 (2012) 32–37.
- [246] M. Rieser, Z. Gu, X. Fang, L. Zebg, K. Wood, J.L. Mclaughlin, Five Novel Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*, *J. Nat. Prod.* 59 (1996) 100–108.
- [247] M. Torres, S. Rachagani, V. Purohit, P. Pandey, S. Joshi, E. Moore, et al., Graviola: A Novel Promising Natural-Derived Drug That Inhibits Tumorigenicity and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo Through Altering Cell Metabolism, *Cancer Lett.* 323 (2012) 29–40.
- [248] N. Oberlies, J. Burgess, Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1–3.
- [249] D.H. Lee, N.H. Thoennissen, C. Goff, G.B. Iwanski, C. Forscher, N.B. Doan, et al., Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma., *Cancer Lett.* 306 (2011) 161–70.
- [250] T. Liu, H. Peng, M. Zhang, Y. Deng, Z. Wu, Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin., *Eur. J. Pharmacol.* 641 (2010) 15–22.
- [251] K.T. Chan, F.Y. Meng, Q. Li, C.Y. Ho, T.S. Lam, Y. To, et al., Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration., *Cancer Lett.* 294 (2010) 118–24.
- [252] K.T. Chan, K. Li, S.L. Liu, K.H. Chu, M. Toh, W.D. Xie, Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562., *Cancer Lett.* 289 (2010) 46–52.
- [253] P.P. Ferreira, A.G. Santos, A.G. Tininis, P.M. Costa, A.J. Cavalheiro, V.S. Bolzani, et al., Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis., *Chem. Biol. Interact.* 188 (2010) 497–504.
- [254] S.L. Da, S. Chaar, T. Yano, Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae), *Eur. J. Pharmacol.* 608 (2009) 76–83.
- [255] O. Kepp, L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, G. Kroemer, Cell death assays for drug discovery., *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 221–37.
- [256] T. Frgala, O. Kalous, R.T. Proffitt, C.P. Reynolds, A fluorescence microplate cytotoxicity assay with a 4-log dynamic range that identifies synergistic drug combinations., *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 886–97.
- [257] B. Arechabala, C. Coiffard, P. Rivalland, L.J. Coiffard, Y. de Roeck-Holtzhauer, Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release., *J. Appl. Toxicol.* 19 (1999) 163–5.
- [258] D. V Krysko, T. Vanden Berghe, K. D'Herde, P. Vandenabeele, Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis., *Methods.* 44 (2008) 205–21.

- [259] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, et al., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009., *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3–11.
- [260] M. Boyd, The NCI In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen, *Anticancer Drug Dev. Guid. Preclin.* (1997) 1985–1995.
- [261] K. Kawada, T. Yonei, H. Ueoka, Comparison of Chemosensitivity Tests: Clonogenic Assay versus MTT Assay, *Acta Medica* 56 (2002) 129–134.
- [262] R.H. Shoemaker, The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen., *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 813–23.
- [263] H. Okada, T.W. Mak, Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells., *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 592–603.
- [264] M. MacFarlane, Cell death pathways--potential therapeutic targets., *Xenobiotica.* 39 (2009) 616–24.
- [265] T. Vanden Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, P. Vandenabeele, Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 135–47.
- [266] M.S. Ricci, W.-X. Zong, Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways., *Oncologist.* 11 (2006) 342–57.
- [267] R.K. Amaravadi, C.B. Thompson, The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment., *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 7271–9.
- [268] M.M. Hippert, P.S. O’Toole, A. Thorburn, Autophagy in cancer: good, bad, or both?, *Cancer Res.* 66 (2006) 9349–51.
- [269] F. Janku, D.J. McConkey, D.S. Hong, R. Kurzrock, Autophagy as a target for anticancer therapy., *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8 (2011) 528–39.
- [270] B. Liu, Y. Cheng, Q. Liu, J. Bao, J.-M. Yang, Autophagic pathways as new targets for cancer drug development., *Acta Pharmacol. Sin.* 31 (2010) 1154–64.
- [271] Z. Darzynkiewicz, D. Galkowski, H. Zhao, Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay., *Methods.* 44 (2008) 250–4.
- [272] S.H. Kaufmann, S.-H. Lee, X.W. Meng, D. a Loegering, T.J. Kottke, A.J. Henzing, et al., Apoptosis-associated caspase activation assays., *Methods.* 44 (2008) 262–72.
- [273] L.E. Bröker, F. a E. Kruyt, G. Giaccone, Cell death independent of caspases: a review., *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 3155–62.
- [274] M. D’Amelio, V. Cavallucci, F. Cecconi, Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death., *Cell Death Differ.* 17 (2010) 1104–14.
- [275] M. van Engeland, L.J. Nieland, F.C. Ramaekers, B. Schutte, C.P. Reutelingsperger, Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure., *Cytometry.* 31 (1998) 1–9.

- [276] R.C. Taylor, S.P. Cullen, S.J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 231–41.
- [277] K.F. Ferri, G. Kroemer, Organelle-specific initiation of cell death pathways., *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) E255–63.
- [278] D. Arnoult, Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays., *Methods.* 44 (2008) 229–34.
- [279] A. Degterev, J. Yuan, Expansion and evolution of cell death programmes., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 378–90.
- [280] J. Massagué, G1 cell-cycle control and cancer., *Nature.* 432 (2004) 298–306.
- [281] P. Pozarowski, Z. Darzynkiewicz, Analysis of cell cycle by flow cytometry., in: A. Schönthal (Ed.), *Methods Mol. Biol. Col. 281 Checkpoint Control. Cancer*, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2004: pp. 301–11.
- [282] P. Zhao, J.L. Fu, B.Y. Yao, Y.R. Jia, Z.C. Zhou, S phase cell percentage normalized BrdU incorporation rate, a new parameter for determining S arrest., *Biomed. Environ. Sci.* 27 (2014) 215–9.
- [283] K.T. Bieging, S.S. Mello, L.D. Attardi, Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression., *Nat. Rev. Cancer.* 14 (2014) 359–70.
- [284] E.C. Pietsch, S.M. Sykes, S.B. McMahon, M.E. Murphy, The p53 family and programmed cell death., *Oncogene.* 27 (2008) 6507–21.
- [285] M. Dohn, S. Zhang, X. Chen, p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes., *Oncogene.* 20 (2001) 3193–3205.
- [286] L. Collavin, a Lunardi, G. Del Sal, P53-Family Proteins and Their Regulators: Hubs and Spokes in Tumor Suppression., *Cell Death Differ.* 17 (2010) 901–11.
- [287] E. Ratovitski, B. Trink, D. Sidransky, P63 and P73: Teammates or Adversaries?, *Cancer Cell.* 9 (2006) 1–2.
- [288] F. Murray-Zmijewski, D.P. Lane, J.-C. Bourdon, P53/P63/P73 Isoforms: an Orchestra of Isoforms To Harmonise Cell Differentiation and Response To Stress., *Cell Death Differ.* 13 (2006) 962–72.
- [289] N. Allocati, C. Di Ilio, V. De Laurenzi, P63/p73 in the control of cell cycle and cell death, *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 1285–1290.
- [290] R.W. Johnstone, A.A. Ruefli, S.W. Lowe, E.M. Victoria, Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy Defects in apoptosis underpin both tumorigenesis and, *Cell.* 108 (2002) 153–164.
- [291] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2000.

- [292] S. Bhatia, C. Sklar, Second cancers in survivors of childhood cancer., *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 124–32.
- [293] K.C. Oeffinger, A.C. Mertens, C. a Sklar, T. Kawashima, M.M. Hudson, A.T. Meadows, et al., Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer., *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 1572–82.
- [294] A.J. Wyrobek, T.E. Schmid, F. Marchetti, Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies., *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 94550 (2005) 31–5.
- [295] J. Hofmann, Resistance to chemotherapy., *Br. J. Cancer.* 99 (2008) 1368.
- [296] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay., *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1084–104.
- [297] H. Norppa, G.C. Falck, What do human micronuclei contain ?, *Mutagenesis.* 18 (2003) 221–233.
- [298] E.M. Parry, J.M. Parry, C. Corso, A. Doherty, F. Haddad, T.F. Hermine, et al., Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals, *Mutagenesis.* 17 (2002) 509–521.
- [299] M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, S. Knasmueller, N. Holland, C. Bolognesi, M.F. Fenech, Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective., *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 759 (2014) 49–58.
- [300] M. Fenech, J. Crott, J. Turner, S. Brown, Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide., *Mutagenesis.* 14 (1999) 605–612.
- [301] S. Bonassi, M. Fenech, C. Lando, Y. Lin, M. Ceppi, W.P. Chang, et al., HUman MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I . Effect of Laboratory Protocol , Scoring Criteria , and Host Factors on the Frequency of Micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37 (2001) 31–45.
- [302] M. Fenech, Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discov. Today.* 7 (2002) 1128–1137.
- [303] K. Noy, M. Tungjai, E.B. Whorton, Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes, *Mutat. Res.* 585 (2005) 96–104.
- [304] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, a Hartmann, H. Kobayashi, et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing., *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [305] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations., *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–61.

- [306] E. Rojas, M.C. Lopez, M. Valverde, Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 722 (1999) 225–54.
- [307] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, et al., Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Animals*. 18 (2003) 45–51.
- [308] M. Valverde, P. Ostrosky-Wegman, E. Rojas, T. Fortoul, F. Meneses, M. Ramírez, et al., The application of single cell gel electrophoresis or Comet assay to human monitoring studies., *Salud Publica Mex.* 41 Suppl 2 (1999) S109–13.
- [309] S.-Y. Park, E. Cho, E. Oh, D. Sul, Comet assay analysis of DNA damage in T- and B-lymphocytes separated by MACS for human biomonitoring studies., *Toxicol. In Vitro.* (2011).
- [310] P. Møller, Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA., *Mutat. Res.* 612 (2006) 84–104.
- [311] D. Anderson, T.W. Yu, D.B. McGregor, Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure., *Mutagenesis*. 13 (1998) 539–55.
- [312] P.L. Olive, J.P. Banáth, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells., *Nat. Protoc.* 1 (2006) 23–9.
- [313] A. Dhawan, M. Bajpayee, D. Parmar, Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models., *Cell Biol. Toxicol.* 25 (2009) 5–32.
- [314] A. Collins, G. Koppen, V. Valdiglesias, M. Dusinska, M. Kruszewski, P. Møller, et al., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project., *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 759 (2014) 27–39.
- [315] S.W. Chiu, Z.M. Wang, T.M. Leung, D. Moore, Nutritional Value of Ganoderma Extract and Assessment of its Genotoxicity and Antigenotoxicity using Comet Assays of Mouse Lymphocytes, *Blood*. 38 (2000) 173–178.
- [316] J. Boik, Natural compounds in cancer therapy. Natural compounds in cancer therapy (2001).
- [317] F.R. Melek , et al. Triterpenoid saponins from *Oreopanax guatemalensis*. *Phytochemistry* 60.2 (2002): 185-195..
- [318] T. Lim, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants Volume 1, Fruits*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2012.
- [319] D.D.L. Moreira, S.S. Teixeira, M.H.D. Monteiro, A.C. a X. De-Oliveira, F.J.R. Paumgarten, Traditional use and safety of herbal medicines, *Rev. Bras. Farmacogn.* 24 (2014) 248–257.
- [320] Y. Chen, J. Chen, X. Li, Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*, *Phytochem. Lett.* 5 (2012) 33–36.

- [321] O. Alvares, A. Neske, N. Chahboune, M.C. Zafra-polo, A. Bardo, Tucupentol , a Novel Mono-tetrahydrofuranic Acetogenin from *Annona montana* , as a Potent Inhibitor of Mitochondrial Complex I, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 335–340.
- [322] L.Q. Wang, W.M. Zhao, G.W. Qin, K.F. Cheng, R.Z. Yang, Four Novel Annonaceous Acetogenins from *annona Montana*, *Nat. Prod. Lett.* 14 (1999) 83–90.
- [323] L.-Q. Wang, B.-S. Min, Y. Li, N. Nakamura, G.-W. Qin, C.-J. Li, et al., Annonaceous acetogenins from the Leaves of *Annona montana*, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 561–565.
- [324] A. Hartmann, U. Plappert, F. Poetter, W. Suter, Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 536 (2003) 27–38.
- [325] M. De Boeck, N. Touil, G. De Visscher, P. a Vande, M. Kirsch-Volders, Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis., *Mutat. Res.* 469 (2000) 181–97.
- [326] P. Stevens, *Clusiaceae-Guttiferae, Flower. Plants· Eudicots.* 255 (2007).
- [327] I.B. Suffredini, M.L. Paciencia, D.C. Nepomuceno, R.N. Younes, A.D. Varella, Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts-Clusiaceae., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101 (2006) 287–90.
- [328] D. Díaz-Carballo, S. Gustmann, A.H. Acikelli, W. Bardenheuer, H. Buehler, H. Jastrow, et al., 7-epi-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells., *Phytomedicine.* 19 (2012) 1298–306.
- [329] M. Huerta-Reyes, M.D.C. Basualdo, L. Lozada, M. Jimenez-Estrada, C. Soler, R. Reyes-Chilpa, HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico., *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 916–20.
- [330] M.J. Balunas, a D. Kinghorn, Drug discovery from medicinal plants., *Life Sci.* 78 (2005) 431–41.
- [331] M. Hemshekhar, K. Sunitha, M.S. Santhosh, S. S.Devaraja, K. Kemparaju, B.S. Vishwanath, et al., An overview on genus *garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects, *Phytochem. Rev.* 10 (2011) 325–351.
- [332] C. Valadeau, J.A. Castillo, M. Sauvain, A.F. Lores, G. Bourdy, The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group, *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 175–192.
- [333] J.S.S. Quintans, E. V. Costa, J.F. Tavares, T.T. Souza, S.S. Araújo, C.S. Estevam, et al., Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols, *Rev. Bras. Farmacogn.* 24 (2014) 60–66.
- [334] S. Subhadhirasakul, P. Pechpongs, A terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis*, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27 (2005) 555–561.

- [335] M.D.F.O. Almeida, A.C. Rodrigues De Melo, M.L.B. Pinheiro, J.R. De Andrade Silva, A.D.L. De Souza, A. Barison, et al., Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE), *Quim. Nova.* 34 (2011) 1182–1187.
- [336] S. a. Dias, A.E.O. Neves, A.B.F. de Ferraz, J.N. Picada, P. Pereira, Neuropharmacological and genotoxic evaluation of ethanol extract from *Erythrina falcata* leaves, a plant used in Brazilian folk medicine, *Brazilian J. Pharmacogn.* 23 (2013) 335–341.
- [337] N. Aghel, Z. Ramezani, S. Beiranvand, Hesperidin from *Citrus sinensis* cultivated in Dezful, Iran., *Pak. J. Biol. Sci.* 11 (2008) 2451–2453.
- [338] A. Ahmadi, S.J. Hosseinimehr, F. Naghshvar, E. Hajir, M. Ghahremani, Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells., *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 794–7.
- [339] T. Tanaka, H. Makita, K. Kawabata, H. Mori, M. Kakumoto, K. Satoh, et al., Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin., *Carcinogenesis.* 18 (1997) 957–65.
- [340] B.D. Sahu, M. Kuncha, G.J. Sindhura, R. Sistla, Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage., *Phytomedicine.* 20 (2013) 453–60.
- [341] J. Teixeira, L. Moreira, M. da S. Guedes, F. Cruz, A new biphenyl from *Clusia melchiorii* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 812–815.
- [342] R. Mangas Marín, R. Montes de Oca Porto, A. Bello Alarcón, A. Nival Vázquez, Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L., *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (2008) 747–751.
- [343] P.R. Ribeiro, C.G. Ferraz, M.L.S. Guedes, D. Martins, F.G. Cruz, A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*., *Fitoterapia.* 82 (2011) 1237–40.
- [344] Y. Nagashio, Y. Matsuura, J. Miyamoto, T. Kometani, T. Suzuki, S. Tanabe, Hesperidin inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by suppressing Th17 activity, *J. Funct. Foods.* 5 (2013) 1633–1641.
- [345] M. Hou, M. Man, W. Man, W. Zhu, M. Hupe, K. Park, et al., Topical hesperidin improves epidermal permeability barrier function and epidermal differentiation in normal murine skin, *Exp. Dermatol.* 21 (2012) 337–340.
- [346] R. Utami, N. Khalid, M.A. Sukari, M. Rahmani, A.B. Abdul, Dachriyanus, Phenolic contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Elaeocarpus floribundus* Blume., *Pak. J. Pharm. Sci.* 26 (2013) 245–50.
- [347] N. Natarajan, R. Thamaraiselvan, H. Lingaiah, P. Srinivasan, B. Maruthaveeran Periyasamy, Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7, *Biomed. Prev. Nutr.* 1 (2011) 207–215.

- [348] H.J. Park, M.-J. Kim, E. Ha, J.-H. Chung, Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4., *Phytomedicine*. 15 (2008) 147–51.
- [349] K. Lee, E. Huang, C. Piantadosi, Cytotoxicity of sesquiterpene lactones, *Cancer Res*. 31 (1971) 1649–1654.
- [350] P.E. Ordóñez, C.L. Quave, W.F. Reynolds, K.I. Varughese, B. Berry, P.J. Breen, et al., Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity., *J. Ethnopharmacol*. 137 (2011) 1055–9.
- [351] J. Wen, K.-R. You, S.-Y. Lee, C.-H. Song, D.-G. Kim, Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide., *J. Biol. Chem*. 277 (2002) 38954–64.
- [352] V. Castro, R. Murillo, C. a Klaas, C. Meunier, G. Mora, H.L. Pahl, et al., Inhibition of the transcription factor NF-kappa B by sesquiterpene lactones from *Podachaenium eminens*., *Planta Med*. 66 (2000) 591–5.
- [353] L.M. Polo, C.M. Castro, M.C. Cruzado, C.J.G. Collino, F.D. Cuello-Carrión, D.R. Ciocca, et al., 11,13-dihydro-dehydroleucodine, a derivative of dehydroleucodine with an inactivated alkylating function conserves the anti-proliferative activity in G2 but does not cause cytotoxicity., *Eur. J. Pharmacol*. 556 (2007) 19–26.
- [354] H. a. Priestap, A. Galvis, N. Rivero, V. Costantino, L. a. Lopez, M.A. Barbieri, Dehydroleucodine and dehydroparishin-B inhibit proliferation and motility of B16 melanoma cells, *Phytochem. Lett*. 5 (2012) 581–585.
- [355] V. V Costantino, S.F. Mansilla, J. Speroni, C. Amaya, D. Cuello-Carrión, D.R. Ciocca, et al., The sesquiterpene lactone dehydroleucodine triggers senescence and apoptosis in association with accumulation of DNA damage markers., *PLoS One*. 8 (2013) e53168.
- [356] G.I. Evan, K.H. Vousden, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer., *Nature*. 411 (2001) 342–8.
- [357] R. Sinha, K. El-Bayoumy, Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds., *Curr. Cancer Drug Targets*. 4 (2004) 13–28.
- [358] T.G. Cross, D. Scheel-Toellner, N. V Henriquez, E. Deacon, M. Salmon, J.M. Lord, Serine/threonine protein kinases and apoptosis., *Exp. Cell Res*. 256 (2000) 34–41.
- [359] T. Thompson, C. Tovar, H. Yang, D. Carvajal, B.T. Vu, Q. Xu, et al., Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis., *J. Biol. Chem*. 279 (2004) 53015–22.
- [360] L. Smeenk, S.J. van Heeringen, M. Koeppel, B. Gilbert, E. Janssen-Megens, H.G. Stunnenberg, et al., Role of p53 Serine 46 in p53 target gene regulation, *PLoS One*. 6 (2011).
- [361] O. Potterat, M. Hamburger, Drug discovery and development with plant-derived compounds., *Prog. Drug Res*. 65 (2008) 45, 47–118.

- [362] A.L. Harvey, R. Edrada-Ebel, R.J. Quinn, The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 111–129.
- [363] H. Itokawa, S.L. Morris-Natschke, T. Akiyama, K.-H. Lee, Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery., *J. Nat. Med.* 62 (2008) 263–80.
- [364] H. Ji, X. Li, H. Zhang, Natural products and drug discovery, *Eur. Mol. Biol. Organ.* (2009) 194–200.
- [365] S. Eckhardt, Recent progress in the development of anticancer agents., *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents.* 2 (2002) 419–39.
- [366] B.B. Aggarwal, S. Shishodia, Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer §, *Cancer.* 71 (2006) 1397–1421.
- [367] P. Anand, A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, O.S. Lai, et al., Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2097–2116.

Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells

Natalia Bailón-Moscoso · Juan Carlos Romero-Benavides ·
Patricia Ostrosky-Wegman

Received: 1 November 2013 / Accepted: 12 January 2014
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2014

Abstract Cancer remains a public health problem with a high unmet medical demand. However, in recent decades, the knowledge of several functional molecular and biological traits that distinguish tumor cells from normal cells, known as the hallmarks of cancer as described by Hannahan and Weinberg, has led to new and modern therapeutic approaches against this disease. Most cancer drugs are deliberately developed for specific molecular targets that involve these hallmarks. In this review, we address the currently available cancer drugs and development of new drugs from the perspective of their interaction with these hallmarks as well as the pathways and mechanisms involved.

Keywords Cancer cell hallmarks · Drug design · Cancer

Introduction

Despite the great efforts made worldwide to find drugs to treat cancer, only some of these drugs, such as imatinib for chronic myelogenous leukemia, trastuzumab for *ERBB2*-amplified breast cancers, and erlotinib and gefitinib for lung cancers that express mutations in the epidermal growth factor receptor [1,

2], are considered successful. It is difficult to develop effective drugs because of the complexity of cancer cells and the tumor microenvironment and the similarity of cancer cells to normal cells. For over 50 years, the search for anticancer drugs has been governed by the fact that tumor cells replicate more rapidly than normal cells and that DNA is the most important molecule in cell division. As a result, DNA is often the therapeutic target of anticancer drugs, and the vast majority of the currently used drugs cause DNA damage, interrupting cell division and subsequently causing cell death.

Recently, the research on the molecular biology and genetics of tumor cells and the development of new technological and methodological tools have allowed the identification of new therapeutic targets with more specific pharmacological activity. However, these advances have also improved our understanding of the mechanisms of action of these drugs. The processes of drug discovery, chemical synthesis, and biological evaluation operate together in an interactive manner.

In 2000, Hanahan and Weinberg described six distinct and complementary capabilities of cancer cells that result in tumor growth and metastasis [3] (Fig. 1). In 2011, the same authors described four additional tumor cell characteristics, including distinctive capabilities and signaling interactions in the tumor microenvironment [4] (Fig. 2). In this review, we analyze the therapeutic strategies that have been guided by these ten capabilities, some of which are shown in Figs. 1 and 2, and the cellular pathway that is influenced.

Sustaining proliferative signaling

Even in the absence of stimulatory signals, tumor cells continue to proliferate. In contrast, normal cells require certain factors, which are generally produced by neighboring cells,

N. Bailón-Moscoso · P. Ostrosky-Wegman (✉)
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional
Autónoma de México (UNAM), Circuito Escolar, Cd. Universitaria,
Coyoacán, 04510 México, D.F., México
e-mail: ostrosky@biomedicas.unam.mx

N. Bailón-Moscoso
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica
Particular de Loja (UTPL), Loja, Ecuador

J. C. Romero-Benavides
Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja
(UTPL), Loja, Ecuador

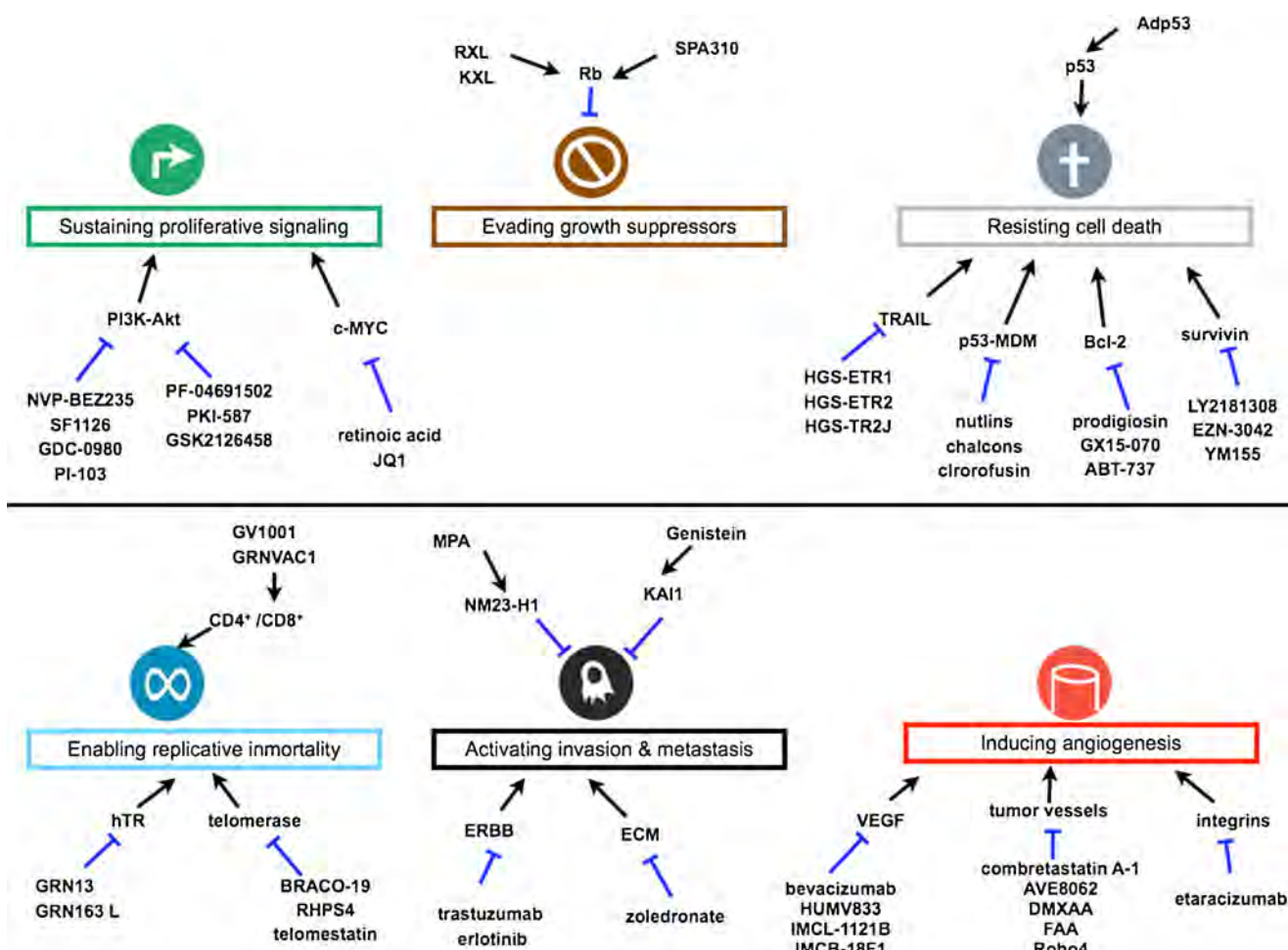


Fig. 1 Therapeutic targeting of the first six hallmarks of cancer: sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, activating invasion and metastasis, and inducing angiogenesis. Some of the pathways involved and

several illustrative examples of drugs for each hallmark are shown. *Beneath* each hallmark, the therapy routes that block their function are depicted, whereas *above* each hallmark the therapies designed to restore their function are noted

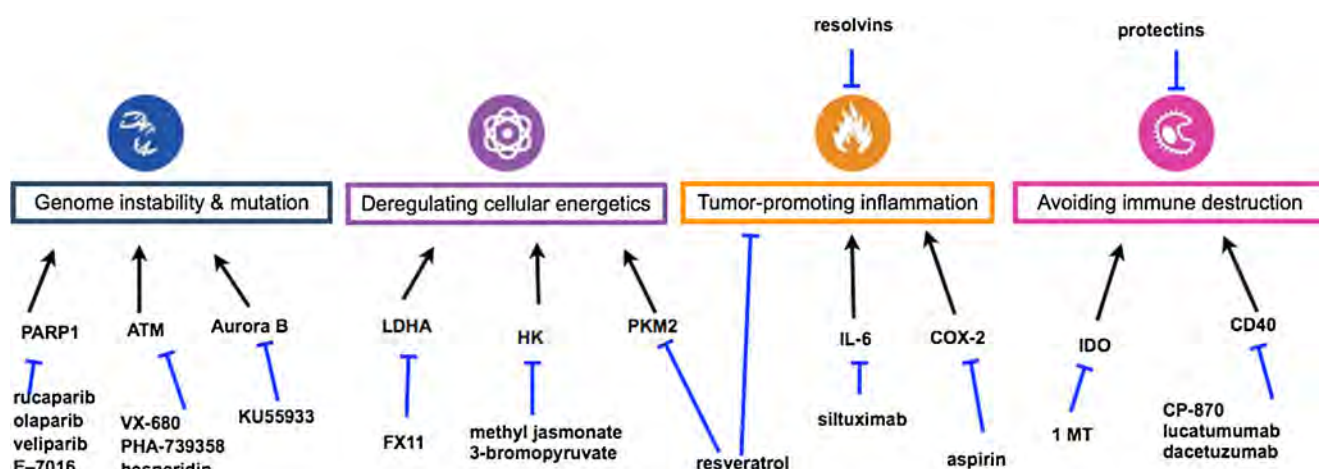


Fig. 2 Therapeutic targeting of the last four hallmarks of cancer: genome instability and mutation, deregulating cellular energetics, tumor-promoting inflammation, and avoiding immune destruction. Some of the pathways involved and several illustrative examples of drugs developed for

each hallmark are shown. *Beneath* each hallmark, the therapy routes that block their function are depicted, whereas *above* each hallmark the therapies designed to restore their function are noted

that allow them to move from a state of rest to a state of active proliferation.

For tumor cells, many of these factors are the result of imitated signals that are produced by oncogenes that are involved in most of the cellular signaling pathways. The phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K)/AKT pathway, which promotes cell growth, proliferation, survival, and migration, is one such pathway [5]. The PI3K constitute a family of lipid kinases that catalyze mammalian target of rapamycin (mTOR) activation, which, in turn, integrates many signals, including growth factor signaling, the energy status of the cell, and nutrient and O₂ availability [6]. From a therapeutic point of view, the proper regulation of mTOR prevents cell division; for this reason, many inhibitors that directly block both PI3K and mTOR, as they are structurally similar and both have a p110 subunit, have been developed. The main advantage of these inhibitors is that they act on certain PI3K isoforms as well as on all mTORC1 and mTORC2 isoforms known to date. Recently developed PI3K/mTOR dual inhibitors include NVP-BEZ235, BGT226, XL765/SAR245409, SF1126, GDC-0980, PI-103, PF-04691502, PKI-587, and GSK2126458. Inhibition of the biological function of PI3K/mTOR has been shown to potently suppress proliferation in a broad panel of tumor cell lines by inducing G1 arrest [7, 8].

Another cell growth signaling pathway is regulated by *c-MYC*. The *MYC* family plays a crucial role in both embryonic and oncogenic development. In normal tissues, *MYC* is a transcription factor that is required for cell proliferation. However, when *MYC* is deregulated during oncogenic events, the *MYC* target genes promote cell growth, evasion of apoptosis, and resistance to chemotherapy [9]. Since the late 1970s, the inhibition of *MYC* has been considered as therapeutic strategy, although *MYC* is a transcription factor and the production of relevant drugs has, therefore, not been easy [10]. *MYC* messenger RNA (mRNA) inhibitors, which have recently become molecules of interest, can be grouped into two types: (1) antisense RNA molecules that act against the mRNA, blocking its translation, and (2) retinoic acid derivatives that reduce the rate of cell proliferation [11]. Retinoic acid, a vitamin A metabolite, decreases the number of growing cells as arrest takes place in the G1 phase of the cell cycle and induces differentiation in certain cell lines, such as those leading to neuroblastomas [12]; this compound has also been shown to have success in vitro [13]. *c-MYC* acts as a transcription factor that binds to DNA; this binding is dependent on bromodomains in chromatin. In 2010, thieno-triazole-1,4-diazepine (JQ1) was reported; its function is similar to *MYC*, which is capable of displacing BET bromodomains by competitive binding, thus decreasing *MYC* activity [14]. *MYC* plays an important role in tumor development in multiple myeloma, and JQ1 has been shown to act synergistically with certain apoptotic agents that produce higher levels of cell

death [15]; as a result, such molecules could be important in the treatment of hematopoietic neoplasms [16]. Other pathways related to cell proliferation that are often altered in tumor cells include the ERBB and vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways, which are also related to angiogenesis, invasion, and metastasis. Drugs with these therapeutic targets will be reviewed later.

Evading growth suppressors

Growth arrest signals can prevent proliferation via two different mechanisms: (1) by forcing cells out of the active proliferation cycle and into an idle state (quiescence) or (2) by inducing cells to definitively reject their proliferative potential by forcing them to enter into a postmitotic state [17]. The cell cycle is regulated by the expression of cyclin-dependent kinases (CDKs) and proteins of the retinoblastoma family (RB, RB1, RBL1, and RBL2), among other molecules [18]. During the transition from G1 to S phase, mitogenic stimuli induce the release of CDKs; CDK4, in conjunction with CDK6, initiates the phosphorylation of RB1, RBL1, and RBL2, leading to an irreversible progression toward S phase; the transition from G0 to G1 is regulated in a similar way [19]. RB has been implicated in many cellular processes, including cell cycle regulation, the DNA damage response, DNA repair, DNA replication, and protection against apoptosis and differentiation. Moreover, the role of *RB* in all these processes may contribute to its function as a tumor suppressor [20].

In cancer, cells typically evade RB signals either by gene mutation or the over-expression of cyclins. Cyclins contain a hydrophobic groove within their structure that is recognized by RB1, RBL1, and numerous other cell cycle substrates, such as the transcription factors p53 and E2F, which can inhibit the expression of endogenous proteins, such as p27 and p21; all of these substrates contain KXL or RXL (Arg/Lys-X-Leu) regions. Small molecules that bind to these RXL or KXL regions and induce apoptosis in tumor cells or inhibit tumor growth in vivo have been developed [21]. Over 15 cyclin inhibitors are currently under evaluation in phase I and II trials; of these, we highlight flavopiridol, an inhibitor of CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, and CDK9 that has proven to be effective in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia [22]. This drug has been tested both alone and in combination with other cytotoxic agents, and the results have been encouraging [23].

Another option for suppressing growth signals is to restore the functions of suppressor genes, such as *RB*. A 39-amino-acid peptide derived from the spacer region of RBL2 (known as SPA310) has been developed. This molecule has the capacity to retain CDK2 inhibitory signals and stops the cell cycle both in vivo and in vitro [24].

Resisting cell death

Apoptosis is a mechanism of controlled cell death whereby the organism maintains cell homeostasis in normal tissue and removes damaged cells [25]. However, despite the accumulation of damage in tumor cells, the induction of apoptosis is altered by different mechanisms. This characteristic of tumor cells has been widely studied [26] and has produced most of the molecular targets and drugs to date. While many drugs ultimately result in apoptotic death, we will review only those drugs that act on the pathways and molecules that are directly related to the apoptotic process. There are two major apoptotic signaling pathways in mammalian cells: the extrinsic and intrinsic pathways [27]. The extrinsic pathway is initiated by cell surface receptors. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Fas ligand (FasL or Apo-1), and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) are located on the cell surface. These receptors have cytoplasmic domains, and their binding constantly relays cell death signals [28]. Both the TNF- α receptor and Fas pathways are important components of normal immune functions. For this reason, although the activation of these receptors can successfully eliminate tumor cells, their toxic side effects on normal cells limit their development as cancer therapies [29, 30]. In fact, systemically administered soluble TNF- α and Fas cause severe toxicity, and only TNF- α has been released as an approved treatment, used alone or in combination [31].

The TRAIL apoptotic pathway can be stimulated by specific agonist antibodies of the death receptor (DR), including HGS-ETR1, HGS-ETR2, and HGS-TR2J. Anti-DR4 and anti-DR5 monoclonal antibodies, either used alone or in combination with chemotherapy or irradiation, induce apoptosis in tumor cells *in vitro* and *in vivo* [31].

The recombinant human TRAIL (rhTRAIL) protein is prominent in the field of cancer therapy due to its specific action on the induction of apoptosis in tumor cells. The administration of rhTRAIL to tumor-bearing animals has been shown to significantly induce tumor regression without producing systemic toxicity [30]. Additionally, in combination with chemotherapy or radiotherapy, rhTRAIL considerably improves antitumor efficacy both *in vitro* and *in vivo*. The combination of rhTRAIL and monoclonal antibodies is being tested in cells with low caspase levels [32].

The intrinsic (or mitochondrial) pathway is activated by DNA damage, ischemia, and oxidative stress, and changes in the permeability of the outer mitochondrial membrane initiate cell death [33]. In this pathway, p53 is important due to its role as a guardian of DNA. The *TP53* gene is inactivated by point mutations in over 50 % of human tumors. The loss of wild-type p53 function allows tumor cells to evade apoptosis and promotes the subsequent selection of the most malignant variants during tumor progression [34]. In recent years, several strategies for the reactivation of the p53 pathway have

been designed and tested. Wild-type *TP53* reconstitution can be achieved with gene therapy by introducing an intact copy of the *TP53* gene using a suitable viral vector, usually adenovirus (known as Adp53) [35]. The use of Adp53 in clinical practice results in the stabilization of tumor growth or even tumor regression, especially in patients with lung cancer or head and neck cancer [36, 37]. However, Adp53 gene therapy has been limited to local administration due to the possibility that the vector might be neutralized by antibodies against viral antigens [31, 35]. To remedy this issue, the use of this vector with other antineoplastic agents has generated promising results. Another therapeutic strategy is to control p53 degradation, which is controlled by a single master regulator oncogene, *MDM2*, that negatively modulates the activity and stability of p53 [38]. The first molecules with MDM2 protein antagonist capacity to be discovered were chalcones; however, they apparently lacked sufficient specificity to be of therapeutic value [39]. Using a bioinformatics design, Zhao et al. synthesized various non-peptidic polycyclic MDM2 antagonists, and their initial evaluation showed that these molecules have moderate affinity for MDM2 and that they induce the intrinsic apoptosis pathway in tumor cell lines. Chlorofusin was identified in a screen of microbial extract libraries [40]. Nutlins are other molecules that are capable of interfering with the interaction between p53 and MDM2. Nutlins show notable selectivity for the p53–MDM2 interaction; these imidazole-type molecules bind to three of the amino acid residues of p53 that interact with MDM2 [41]. Moreover, the activation of the p53 pathway by nutlins in cancer cells causes cell cycle arrest in G1 and G2 and apoptosis via a caspase-dependent pathway. RITA is another compound that activates wild-type p53 in human tumor cells, thus preventing degradation by MDM2. This compound was identified by the National Cancer Institute (NCI) of the United States of America and binds to the N-terminal region of p53, causing a conformational change that prevents MDM2 binding, resulting in the accumulation of p53 and the upregulation of *TP53* target genes [35].

Tumor cells are also able to evade death through the overexpression of the antiapoptotic genes of the *BCL-2* family (*BCL-2*, *BCL-XL*, *BCL-W*, and *MCL1*) [42]. Even the aberrant expression of these proteins correlates with poor results after traditional chemotherapy protocols [43]. In recent years, several screening procedures have been used to identify small molecules that can be used as tools against cancer by blocking proteins such as BCL-2 and BCL-XL [35]. For example, HA14-1, which binds to a surface pocket of the BCL-2, is in preclinical development. Using various natural product libraries, bipyrrolidineprodigiosin was identified. The optimization of this product resulted in GX15-070 (Obatoclax[®]), which binds BCL-2, BCL-XL, and BCL-W; it is currently in preclinical trials for use either as a single agent or in a combination regimen [44]. Gossypol, another natural product obtained

from cotton plant with the same effect, binds to BCL-2, BCL-XL, and MCL1 [45] and is currently in phase II clinical trials under the name AT-101 [46]. Studies of the structure–activity relationship and nuclear magnetic resonance imaging of various molecules that focused on selecting fragments or ligands with high binding efficiency for the hydrophobic groove of BCL-XL identified ABT-737 [47]. This compound does not block the activity of MCL-1, BFL1/A1, or BCL-B; it instead displaces BH3 proteins, such as BIM, and activates proapoptotic proteins, such as BAX and BAK, inducing apoptosis in the tumor cells of patients with leukemia, lymphoma, multiple myeloma, glioblastoma, and small cell lung cancer [46].

Most caspases play key roles in programmed cell death, some as initiators (caspase-8, -9, and -10) and others as effectors (caspase-3, -6, and -7) [33]. However, there are also proteins that bind to caspases and inhibit their function, allowing cells to evade apoptosis. These compounds are known as inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) and X-linked inhibitors of apoptosis proteins (XIAPs) [48]. Caspase binding occurs through their BIR domains. XIAPs bind to the BIR3 domain of caspase-9; SMAC, a protein that is released from the mitochondria during apoptosis, also binds to the same BIR3 domain. The inhibition of IAPs and XIAPs has been proposed as a strategy for treating cancer, and peptides that are structurally similar to SMAC and have the capability of reactivating apoptosis have been developed. These molecules alone have not been entirely successful; however, in conjunction with other drugs, they increase or induce tumor cell apoptosis [49]. Survivin, another IAP, also promotes cell proliferation and invasion [50]. Survivin is absent in most adult tissues but is selectively localized in many human tumors, where its overexpression results in poor prognosis and treatment resistance [51]. Survivin is a difficult target for classical drug development, but some expression inhibition strategies have been developed and are in preclinical phase [52]. LY2181308 is an antisense oligonucleotide (ASO) that binds survivin mRNA, resulting in either mRNA degradation or translation inhibition. Preclinical studies demonstrated that LY2181308 decreases survivin at both the mRNA and protein level in multiple tumor cell lines and xenografts, resulting in cell cycle arrest, increased apoptosis, and tumor growth inhibition. Preclinical studies have also shown that LY2181308 sensitizes cells to cytotoxic therapies [53]. SPC3042, also known as EZN-3042, is a locked oligonucleotide (LNA) that targets survivin [54]. LNAs increase the stability and potency of inhibition more than ASOs. In prostate cancer cells, the survivin levels are reduced when the cells are exposed to SPC3042/EZN-3042, producing cell cycle arrest, inducing apoptosis, and decreasing the BCL-2 levels. This oligonucleotide is currently under evaluation for the treatment of acute lymphoblastic leukemia, to be used either alone or in combination with traditional chemotherapy.

YM155 is an imidazole-based small molecule that was identified as a selective inhibitor of survivin expression; its mechanism of inhibition appears to be independent of the cell cycle and is specific for a 269-bp core promoter region. In preclinical studies, the inhibition of survivin by YM155 has proven to be effective at inhibiting Merkel cell carcinoma [55].

The most notable conceptual advance has involved other forms of cell death that broaden the scope of “programmed cell death” as a barrier to cancer [4]. Autophagy represents an important cell–physiologic response. Like apoptosis, the autophagy machinery has both regulatory and effector components. Autophagy is a lysosomal degradation pathway that degrades cellular organelles and proteins in order to maintain cellular biosynthesis and viability during metabolic stresses such as nutrient deprivation [56, 57]. However, due to the complex two-faced nature of autophagy, establishing the dual role of autophagy in tumor survival vs death may help in determining the cancer therapeutic potential. Inhibiting autophagy may enhance the efficacy of currently used anti-cancer drugs in chemotherapy- and radiotherapy-induced activation of autophagic signaling pathways. On the contrary, promoting autophagy may induce cancer cell death with high thresholds to apoptosis [58–60]. Therefore, the therapy depends on the condition of the tumor, although the autophagy pathways are not precisely known; within the cancer therapy being studied, both autophagy inhibitor (bortezomib, NPI-0052, epoxomicin) as well as compounds stimulate autophagy (chloroquine, quinacrine, methyladenine).

Enabling replicative immortality

In principle, normal cells inherently carry a stand-alone program that limits their ability to proliferate and multiply; this program appears to operate independently of the signaling pathways between cells. Hayflick demonstrated that, *in vitro*, some cell populations stop dividing once they have gone through a certain number of divisions, a process that he called “senescence” [61]. In 1985, Greider and Blackburn discovered telomerase, an enzyme that synthesizes the DNA of telomeres and confers stability to the DNA molecule; in the absence of this enzyme, telomeres gradually become shorter, preventing DNA replication and the processing of the terminal part of the chromosomes, leading to cell cycle arrest or death [62]. The maintenance of telomeres and replicative immortality are apparently crucial to tumor progression. In addition, because telomerase is encoded by single genes (non-redundant), it is less likely that tumors would develop resistance to therapies directed against telomerase. Because telomerase is expressed at low or transient levels in normal tissues, including normal stem cells, and as telomeres are usually longer in normal cells than in tumor cells, drugs targeting telomerase would have increased specificity and

would therefore reduce the likelihood of toxicity to normal tissue. These factors suggest that anticancer drugs targeting telomerase may have a wide therapeutic window [63]. In this review, we analyze various compounds that have been developed to take advantage of this phenomenon; the majority of these compounds are already in clinical trials.

The RNA component hTR, which is necessary for telomerase reverse transcription, has been considered a good target for “chain antagonist” oligonucleotide inhibitors; the most promising molecules are GRN13 and its derivative GRN163 L [64]. GRN163 L has a high affinity for the single-stranded region of the telomerase template and, in turn, blocks access of the telomere to telomerase; this leads to the inhibition of telomerase, telomere shortening, and ultimately cell cycle arrest and/or death. Efficacy studies have been conducted with GRN163 L in a mouse xenograft model with various human tumors, including lung, breast, prostate, kidney, and brain tumors, and hematologic malignancies, such as multiple myeloma and lymphoma [65]. GRN163 has appropriate pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and is sufficiently powerful, efficient, and safe. In addition, a synergistic effect occurs when GRN163 L is used with other medications or with irradiation [66].

Telomerase and telomerase reverse transcriptase (TERT) complex peptides act as epitopes as they are capable of stimulating the histocompatibility complex and producing cytotoxic T lymphocyte responses, thus providing protective immunity against tumors [67]. GV1001 and GRNVAC1 were designed to stimulate the response of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes [68]. GV1001 is a 16-amino-acid peptide of the major histocompatibility complex (MHC) class II-restricted hTERT. GV1001 is processed to endogenously produce MHC class I molecules and stimulate the response of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. GRNVAC1 consists of a preparation of mature autologous dendritic cells that are transduced with mRNA derived from the TERT lysosome-associated membrane protein and fused to constructed cDNA. The nearest integral TERT segment coded by GRNVAC1 is processed by autologous dendritic cells that ensure that the immune response is polyclonal; however, it is essentially specific for any TERT epitope that is expressed by the patient's tumor [67]. GV1001 is currently in phase II and III trials for the treatment of small cell lung cancer and pancreatic cancer, respectively, whereas GRNVAC1 is in phase II trials for the treatment of acute myelogenous leukemia [69].

Anti-telomerase agents should ultimately lead to telomere shortening, which gradually decreases proliferation once the telomeres have reached a critically short length [70]. This paradigm has been verified by several experiments that were designed to validate telomeres as a new therapeutic target. It has become increasingly clear that DNA can adopt a variety of alternative conformations based on specific sequence motifs and the interaction between the DNA and a variety of proteins,

including G-quadruplex structures (G4); these structures only occur under physiologically relevant conditions, function *in vivo*, and contribute to the extension of telomeres [71]. G4-interacting agents are small molecules able to bind to, and stabilize, the telomeric DNA in a quadruplex conformation, thereby inhibiting telomere extension by telomerase. Also, results from different groups indicate that G4 ligands might disrupt telomere architecture in both telomerase-positive and ALT-positive tumors, causing immediate and profound effects on cell proliferation. BRACO-19, RHPS4, and telomestatin are three of the most studied G4 ligands. Telomestatin is one of the most potent small molecules that bind to G4 motifs, with high selectivity for tumor cells and minimal effects on normal cells. Telomestatin is a natural product with a complex structure composed of a variety of polyoxazole rings that form macrocyclic bonds; this compound promotes the formation and stabilization of the G4 structure by binding to guanosines at both ends of G4 [72]. Because telomestatin can cause telomere shortening earlier than expected in different tumors, it is likely that telomerase inhibition is responsible for this effect [66]. Telomestatin inhibits the proliferation of tumor cells at low IC₅₀ values in several tumor cell lines, including breast and pancreatic tumors, cervical cancer, myeloma, neuroblastoma, and chronic myelogenous leukemia [67].

BRACO-19 and RHPS4 are promising stabilizer molecules for G4 ligands; they are similar in structure to telomestatin but have less tumor selectivity. Studies have shown that BRACO19 can be a successful therapy when used as a single agent for tumors with shorter telomeres [73], and RHPS4 works best when used in combination with other therapies [74].

Single-wall carbon nanotubes were the first reported ligands to selectively stabilize human telomeric DNA i-motifs; therefore, they represent prototype molecules that could function as telomerase inhibitors [75].

Activating invasion and metastasis

Metastasis is a complex process by which malignant tumor cells move away from the main organ, invade the membranes of connective tissue structures, travel to a distant site via lymphatic or hematogenous circulation, and eventually establish a position that is clinically detectable in distant organs [76].

Although until now no drugs that were created to inhibit the metastatic process have been approved by the FDA, some of these drugs, which were developed to use the same strategies used by other drugs (i.e. using genes involved in metastasis as targets), are in clinical trials. Despite the fact that metastasis is an extremely complex process and although we do not yet fully understand the biochemical and genetic changes that control this process, at least 23 metastasis suppressor genes

have been identified. In 1998, non-metastatic cell 1 (*NME1*, also known as *NM23*), the first identified metastasis suppressor gene, was discovered. *NM23* expression can abrogate spontaneous metastasis without affecting tumor cell growth in vitro and in vivo [77]. Preclinical results show that medroxyprogesterone acetate appears to increase the level of NM23-H1, thus reducing metastatic colonization [78]. Other genes that are important for therapy are *KAI1* and *KMI* [79]. The *KAI1* is an endogenous metastasis suppressor gene; the key suppressor functions described for its protein include the downregulation of epidermal growth factor signaling and endocytosis. Genistein, an isoflavone isolated from soy that was found to reverse the effects of *KAI1* loss in prostate cancer cells in a mouse model, has been used to re-express endogenous *KAI1* in prostate cancer [80]. Traditional gene therapy techniques used in pancreatic cancer cell xenografts established as subcutaneous tumors in nude mice have also substantially reduced spontaneous lung tumor metastasis [81].

Patients with advanced breast cancer and prostate cancer usually develop bone metastases. Bone metastases usually cause severe bone pain due to osteolytic or osteoblastic bone lesions. Bisphosphonates, which are analogous to pyrophosphates, have high affinities for bone mineralization surfaces and inhibit osteoclastic bone resorption; therefore, they may decrease bone tumor burden [82]. In addition, tumor invasion requires the adhesion of cancer cells to the extracellular matrix (ECM), the pericellular proteolysis of the ECM, and the subsequent migration of cancer cells; bisphosphonates also appear to inhibit the adhesion of breast and prostate cancer cells to the ECM in vitro, thus preventing the spread of cancer cells to the bone. Zoledronate has been shown to reduce the adhesion of prostate cancer cells to the mineralized bone matrix. Moreover, the treatment of bone marrow stromal cells with zoledronate results in a significant reduction in the expression of various cell adhesion molecules [83, 84].

As mentioned previously, another proliferation pathway is the ERBB pathway. The ERBB2 human epidermal growth factor receptor (also known as HER2/neu) exhibits activity on osteoblastic lesions. ERBB2 is a member of the epidermal growth factor family of receptor tyrosine kinases (erbB family); these proteins are potent mediators of normal cell growth and development [85, 86]. This receptor has been shown to be a potent target for cancer therapy, including antibody-based therapies to prevent ligand binding and dimer formation. Trastuzumab [87] and erlotinib are the most successful drugs used to treat breast cancer with amplification of ERBB2 (also known as HER2); gefitinib is used in lung cancers that express a mutated version of the epithelial growth factor receptor [88].

Inducing angiogenesis

Blood vessels provide oxygen and nutrients that are crucial for cell function and survival. After new tissues are formed, the

formation of new blood vessels is typically adequately regulated. In tumor development, the process of angiogenesis is characterized by an abnormal increase in the number of proliferating endothelial cells and the morphological alteration of blood vessels [89]. The transition from a tumor microenvironment to a pro-angiogenic state is part of the tumor progression process and is characterized by the deregulation of certain factors and their receptors. The development of drugs that interrupt angiogenesis has advanced rapidly over the last 30 years. Most of these drugs focus on the inhibition of both soluble pro-angiogenic factors (VEGF, EGF, PDGF, interleukins) and their receptors, which tumor cells are able to produce and secrete [90, 91]. Bevacizumab (Avastin, Genentech), the first anti-VEGF-A antibody, is used to treat colorectal cancer [92]. Other inhibitor antibodies against various types of VEGF include HUMV833, IMCL-1121B, and IMCB-18 F1; however, these compounds are still being evaluated in clinical trials [93]. Small-molecule inhibitors of tyrosine kinases, such as sorafenib, sunitinib, and imatinib, which block the signaling of pro-angiogenic factors, are considered to be the most successful drugs in certain types of cancer [94].

Blood flow and pressure influence vascular development and remodeling through the creation of a mechanical and sensory complex. Fibronectin is a large glycoprotein that is present in large quantities in the plasma and tissues; extra domain-B (EDB) of fibronectin, which is produced by alternative splicing during primary transcription and consists of 91 amino acids, is inserted into the fibronectin molecule and is prominently expressed in developing embryos and during angiogenesis in tumor tissues [95]. The EDB protein is abundant in many aggressive solid tumors but is almost undetectable in healthy adults. EDB has a high affinity for the anti-human L19 antibody, which has been shown to effectively identify blood vessels in tumors in animal models and cancer patients following intravenous injection [96]. A large number of therapeutic derivatives of L19, such as fluorochrome and photosensitizer conjugates, liposomes, procoagulant agents, cytokines, enzymes, and other proteins [97], have been produced and tested in animals.

During angiogenesis, integrins are essential for the migration, proliferation, and survival of endothelial cells. Many integrins are involved directly or indirectly in regulating endothelial cell functions. Both the $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins appear to be associated with tumor angiogenesis because of the interaction between $\alpha V\beta 3$ and the matrix and because $\alpha V\beta 5$ plays an important role in the maintenance of the tumor vasculature [98]. Cationic nanoparticles coupled to an $\alpha V\beta 3$ integrin ligand, which allows for selective delivery to the angiogenic genes of the blood vessels, have been shown to provide a significant therapeutic benefit to tumor-bearing mice [96]. Integrins have also been selected as direct

therapeutic targets; the mAb antibody etaracizumab (Vitaxin®) is in clinical development as an anti-angiogenic therapy that specifically targets integrins.

The vascular therapy approaches reviewed earlier aim to prevent the formation of new vessels in the tumorigenic process. However, other agents that are capable of damaging the vasculature, causing a rapid and selective decrease in the stability of tumor vessels and resulting in the death of secondary cells, have been developed. Molecules that are structurally related to colcemid, a classical chemotherapeutic agent that binds to tubulin, have been developed to destabilize tumor vessels; one example of this type of drug is combretastatin, which was isolated from the African willow tree *Combretum caffrum* [99]. The sodium phosphate salt of combretastatin A-1 was shown to be the most potent inhibitor of tumors developed by VDA (oxygenated OXI4503) in preclinical models. Other synthetic molecules that are similar to combretastatins have been developed: AVE8062 (Aventis Pharma), for example, compared to colchicine and other agents that bind to microtubules, presents a much broader therapeutic window in animal models; DMXAA and FAA are two synthetic molecules that have a series of anti-vascular properties, including the induction of cytokines [90].

By comparing various normal tissues with tumors, it has been shown that the endothelial transcriptome has two important characteristics. First, the endothelial cells of various tissues have unique molecular characteristics. Second, the expression of various gene systems causes endothelial cells to undergo various forms of angiogenesis, providing an opening for new therapies targeting molecules that are only expressed in the context of tumor angiogenesis. This strategy has the added benefit of avoiding interruption of the physiological angiogenesis that occurs during the female reproductive cycle and wound healing [100]. The Robo4 protein is specifically expressed in endothelial cells and belongs to the roundabout axon guidance receptor family, which is involved in the axonal guidance of blood vessels; levels of this protein are high in the endothelial cells of tumor vessels but not in the endothelial cells of normal vessels [101]. The extracellular domain of Robo4 has been shown to block angiogenesis in in vivo and in vitro models [102].

Genome instability and mutation

The distinctive features of tumor cells are largely related to a sequence of genomic alterations in neoplastic cells that are produced by the subclonal selection of mutant genotypes with a selective advantage [103]. Genes that are related to the development of genetic instability are known as “housekeeping” or “maintenance” genes and are mainly involved in the prevention, detection, and repair of DNA damage [104]. One of the most studied of these genes is *PARP1*, which produces a

predominantly nuclear protein that senses single-stranded DNA damage and aids in its repair [105]. Many commonly used chemotherapeutic agents, such as DNA-alkylating agents and camptothecins, cause DNA damage, producing single-strand breaks. To enhance this effect, several PARP inhibitors, known as chemotherapy-enhancing agents, have been developed [106–110]. Catalytic-type inhibitors are the likes of rucaparib (AG014699), olaparib (AZD-2281/KU-0059436) [111], veliparib (ABT-888), LT-673, BMN-673, and E-7016 (GPI-21016) [112–114]; noncompetitive inhibitor of PARP, iniparib (BSI-201), which has been studied extensively in clinical trials, is administered both alone and in combination to act as a chemo- and radio-sensitizing agent, initially used in combination with temozolomide [115]. Toxicity, especially myelosuppression, remains a major concern moving forward into the phase III trial paradigm, particularly with continuous rather than intermittent dosing of PARP inhibitors. As yet uninvestigated are the long-term consequences of PARP inhibition [106, 114, 115]. Synthetic lethality is described as a phenomenon where only the simultaneous perturbation of two genes results in a deadly combination. The proof of principle that the synthetic lethality concept is clinically translatable is the efficacy of drugs that target the PARP in tumors with mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* [107, 116, 117]. PARP inhibitors can also be used for single mutant *BRCA1/2* tumors that are sensitive to monotherapy. Although the chemical structure of E-7449 has not been disclosed, pre-clinical data show the ability of the compound to potentiate the cytotoxic effects of both radiotherapy and chemotherapy. The compound has also been reported to inhibit tumor growth in *BRCA*-deficient xenograft models, with no toxicity after oral administration once daily as a single agent [118]. Other PARP inhibitors, such as PF-01367338 and BSI-201, are undergoing evaluation in phase II trials of patients with *BRCA*-associated advanced ovarian cancer [119, 120]. Given the need to improve the therapeutic outcomes for patients with HR-deficient tumors such as high-grade serous ovarian cancer, as well as the tantalizing activity of PARP inhibitors in this setting, further preclinical and clinical efforts to understand this new class of agents appear to be warranted [107, 119].

Another therapeutic target within the group of “housekeeping genes” is *ATM*, which specifically responds to double-stranded breaks in DNA and is a major player in the G1/S and Chk2 checkpoints [120]. *ATM* is also involved in the activation of AKT, rendering it as a therapeutic target for cancer treatment [121]. As we mentioned previously, the activation of the PI3K/AKT pathway stimulates tumor progression by promoting cell proliferation and cell survival. KU55933 is an *ATM* inhibitor that prevents the phosphorylation of *ATM*, thereby blocking the phosphorylation of AKT and inhibiting cell proliferation in cancer cell lines [122]. KU55933 is a specific inhibitor of *ATM* with a selectivity that is at least 100 times greater than that of other related kinases, including PI3K [123]. In combination therapy with agents that cause

double-strand breaks, such as radiation or temozolomide, KU55933 has produced encouraging results [124, 125]. Indeed the inhibition of ATM kinase is critical for DNA repair and sensitizes cells, thereby increasing the pharmacological effect of the compound [110].

The Aurora kinase family is also related to the process of tumorigenesis, especially in terms of the generation of chromosomal instability [126]. For example, when Aurora A is overexpressed, aneuploid cells that contain multiple centrosomes and multiple axes are produced, causing the cellular transformation of fibroblasts both in vivo and in vitro [126, 127]. The overexpression of Aurora B kinase results in the disruption of kinetochore microtubules, the formation of grooves, cytokinesis, and ultimately polyploidy [128]. Aurora kinases have attracted much attention in recent years in both the academe and the pharmaceutical industry, and a great variety of ATP-competitive inhibitors, including VX-680, PHA-739358, R763, MLN8054, MLN8237, PF-03814735, AZD1152, GSK1070916, and hesperidin, are currently in clinical development [129–132]. Interestingly, in preclinical in vivo studies, inhibitors of Aurora kinases were found to suppress tumor growth regardless of their specificity profiles, highlighting the therapeutic potential of drugs that target Aurora A and B. However, these drugs also have associated toxicity, sometimes producing myelosuppression and neutropenia.

Deregulating cellular energetics

In the altered microenvironment of the tumor, cancer cells undergo profound changes in their intrinsic metabolism. Cancer cells tend to undergo metabolic reprogramming by increasing aerobic glycolysis and dysregulating lipid metabolism in a process known as the “Warburg effect” [133]. In many cancer cells, bioenergetic reprogramming involves changes in ATP production by oxidative phosphorylation in quiescent and differentiated cells; indeed cancer cells require energy for the generation of substrates for biogenesis and rapid cell reproduction [134]. The state of hyperglycolysis that is specific for tumor cells could lead to the development of selective antitumor therapies; for example, the inhibition of glycolysis mediated by 2-deoxy-D-glucose (2DG) significantly increases cisplatin cytotoxicity in head and neck cancers, and phase I/II clinical trials are ongoing in patients with advanced solid prostate tumors [135]. However, there is concern that 2DG might compromise glycolytic metabolism in the brain and heart, and it is unclear how wide a therapeutic window is necessary to warrant clinical development. Hexokinase (HK), one of the major isoenzymes that phosphorylates glucose to initiate glycolysis, is frequently overexpressed in human tumors, and a stronger bond is formed between hexokinase and the voltage-dependent anion

channels (vDAC) of the mitochondria in cancer cells than in normal cells [136]. Strategies to disrupt the interaction between HK and outer membrane vDAC have been shown to preferentially kill tumor cells both in vitro and in vivo by promoting mitochondrial pore opening. 3-Bromopyruvate is one such molecule. Previous studies have shown that 3-bromopyruvate is highly effective in achieving tumor cell death in animal models with Warburg phenotype implanted tumors [137].

Another HK inhibitor is methyl jasmonate, a phytohormone that alters the interaction between HK and vDAC, causing the inhibition of glycolysis and MOMP induction [138]. Methyl jasmonate has shown selective anticancer activity in clinical studies [139]. Glucose metabolism largely depends on the pyruvate kinase enzyme; most adult tissues express pyruvate kinase M1 (*PKM1*), while pyruvate kinase M2 (*PKM2*) is expressed during embryonic development; tumor cells, in contrast, exclusively express *PKM2*. Despite the similarity between *PKM2* and the other *PKM* isoforms, selective inhibition has been possible [140]. *PKM2* can be selectively blocked through iRNA, causing cell death [141], by natural hydroxynaphthoquinone molecules, such as shikonin and alkanin [142], or by resveratrol, which is also of natural origin and capable of inhibiting *PKM2* in vitro in MCF-7 cells [143].

In addition to its important role in cellular metabolism, lactate dehydrogenase A (LDHA) is also a target of the *MYC* gene [144]. This enzyme is essential for the production of lactate in the Warburg effect and, therefore, for tumorigenesis. The inhibition of LDHA inhibits aerobic glycolysis [145]. FX11 [3-dihydroxy-6-methyl-7-(phenylmethyl)-4-propylnaphthalene-1-carboxylic acid] inhibits LDHA, triggering oxidative stress in cancer cells and necrotic cell death; FX11 is able to induce the regression of lymphoma [141]. Discoveries of recent years have shown that it is feasible to develop drugs that target cancer metabolism, thus revealing new pathways to identify unique classes of anticancer drugs [146].

Avoiding immune destruction

While tumor cells should, in theory, stimulate the host's immune response and thereby trigger their own elimination, this does not always happen, and many tumor cells can evade cellular rejection [147]. Tumor cells often use strategies that promote the evasion of immune recognition; such strategies include physical exclusion from the immune cells at the tumor site, the adaptation of poor immunogenicity via a reduction in the expression of MHC, and the promotion of cell recognition errors by natural killer cells (NK). In addition, some tumors prevent the triggering of an inflammatory response by secreting a large number of immunomodulatory factors that both

interfere with the activation of dendritic cells and T cells and block the production of proinflammatory cytokines [148]. Despite these obstacles, modern therapies based on the immune system continue to show the greatest potential for the treatment of malignancies, and immune therapy has been established as a central component of many cancer treatments [149]. Tumors express a wide variety of proteins that can be recognized by the immune system. Certain manipulations that activate antitumor immunity have been employed in certain therapies; these include the administration of cytokines, passive immunization with monoclonal antibodies, and the introduction of adjuvants in the tumor microenvironment.

In a normal physiological state, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is important for creating an environment that limits tissue damage due to an overactive immune system; however, by promoting immune suppression, IDO may facilitate the survival and growth of tumor cells that express unique antigens that would normally be recognized as foreign [150]. In preclinical studies, small-molecule inhibitors of IDO, such as 1-methyl tryptophan (1-MT), have been demonstrated to reverse this immunosuppressive mechanism. The joint administration of 1-MT and traditional chemotherapeutic agents in animal models offers new and attractive treatments for human tumors [151, 152].

The administration of monoclonal antibodies has proven to be one of the most successful principles of cancer immunotherapy. Examples of antibodies that have been applied to inhibitors of different molecular targets have been mentioned in previous sections. The systemic administration of monoclonal antibodies can generate an immediate immune response, unlike endogenous immunity [68]. Because therapeutic antibodies are initially produced in animals, treatments may be limited by hypersensitivity reactions; however, these reactions have been minimized by the insertion of human IgG1 sequences outside of the antibody binding domain. Almost a dozen monoclonal antibodies have been approved for clinical treatment, mainly for colorectal cancer and other malignancies. Rituximab, the first approved monoclonal antibody, has been widely used alone and in combination with other antineoplastic agents, such as cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, as part of the standard treatment for non-Hodgkin lymphoma [153, 154]. Numerous therapeutic antibody-based strategies have been developed with the aim of directing immune cells to enhance antitumor immune responses. CD40, which is constitutively expressed in antigen-presenting cells, is a member of the tumor necrosis factor receptor family; it promotes functional maturation, leading to an increase in antigen presentation and cytokine production, and facilitates antigen cross-presentation. Many tumors express CD40, including carcinomas of the ovary, nasopharynx, and bladder [155]. There is evidence in the literature that CD40 agonist antibodies may exert their antitumor activity via two different mechanisms: a direct

mechanism in which anti-CD40 induces the antibody-dependent phagocytosis of tumor cells and inhibits the proliferation induced by CD40-CD40 L and an indirect mechanism in which antitumor immune responses are activated through the maturation of antigen-presenting cells [156]. CD40 agonist antibodies include CP-870, 893, lucatumumab, and dacetuzumab, which are being tested in clinical trials [157, 158].

Active immunization against tumor antigens with anti-CTLA-4 antibodies has been shown to produce high inhibition of T cells [159]. The restoration of the antitumor immune response could be systematically applied to many tumor types and would allow the immune system to detect and eradicate tumors at a relatively early stage.

Tumor-promoting inflammation

Different causes, mechanisms, and intensities of inflammation occur in carcinogenesis, during tumor growth, invasion, and metastasis and during therapy [160]. The inflammatory response precedes tumor development in cases of infection with tumorigenic pathogens (*Helicobacter pylori*, Hepatitis virus, and *Schistosoma*) [161], in cases of chronic disease (autoimmune diseases and obesity), and during exposure to environmental carcinogens (tobacco smoke particles and asbestos) [162]. Epidemiological and experimental studies have revealed that a variety of phytochemicals present in our daily diet are potential chemopreventive agents that may alter or correct unwanted cell functions caused by abnormal proinflammatory signal transmissions; secondary metabolites with this activity include curcumin, resveratrol, ursolic acid, capsaicin, and silymarin [163]. Dietary fat may contribute to inflammation-associated cancer via the abnormal metabolism of arachidonic acid; however, the consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acids has been shown to prevent carcinogenesis. Endogenous chemical mediators, such as protectins and resolvins, have been derived from these acids; these molecules act as immunomodulators and play a key role in the resolution of inflammation, respectively [164]. Similarly, the combination of docosahexaenoic acid and COX-2 inhibitors results in the synergistic elimination of neuroblastoma cells [165]. The inflammatory process is mediated by eicosanoids, such as cyclooxygenases (COX 1 and 2), lipoxygenases (5-LOX, 12-LOX, 15-LOXa, and 15-LOXb), and cytochromes P450, which are generated from arachidonic acid by different enzyme systems. These pathways are the targets of drugs that have been approved for the treatment of pain, asthma, allergy, and cardiovascular disorders and are also being tested as anti-cancer substances [166]. Most research has focused on the COX and LOX pathways; however, a number of alternative ideas have been proposed, including the production of antagonists to the receptors of components of these pathways, the overexpression of eicosanoid-metabolizing enzymes, and the use of

endogenous anti-inflammatory lipid mediators [167]. Several non-steroidal anti-inflammatory drugs, which are COX-2 inhibitors, tend to reduce the incidence of tumors when used as prophylactic drugs; aspirin, in particular, effectively prevents colon cancer, breast cancer, and prostate cancer [168]. Like aspirin, these drugs are not very specific and generally have side effects that preclude their long-term administration in most patients, except high-risk individuals. The proper screening of patients who could benefit from prevention strategies should improve the effectiveness and usefulness of these cancer prevention therapies [169]. Humans differ in their response to drugs for multiple reasons but particularly as a result of inter-individual genetic differences in drug absorption, distribution, metabolism, and excretion. All of these are potential sources of pharmacokinetic variability and can have significant effects on treatment outcomes; for example, it has been demonstrated that only aspirin users with a wild-type *CYP2C9* or a variant *UGT1A6* genotype had a reduced risk of adenomas, whereas individuals with other genotypes did not seem to derive chemopreventive benefit from aspirin use [170].

Most, if not all, solid malignant tumors trigger an intrinsic inflammatory response that results in a pro-tumorigenic microenvironment. In addition to autonomous cell proliferation, certain oncogenes, such as the *RAS* and *MYC* family members, induce a transcriptional program that leads to the remodeling of the tumor microenvironment through the recruitment of leukocytes, the expression of tumor-promoting chemokines and cytokines, and the induction of an angiogenic switch [168]. These effects have been confirmed in vitro with the use of neutralizing antibodies against different chemokines (anti-CXCL12/CXCR, anti-CXCL, anti-CXCL2/CXCR2, anti-CCL2/CCR2, anti-CXCL13/CXCR5, anti-CCL5-/CCR5, and anti-CCL11/CCR2) that block the anti-apoptotic and proliferative effects of tumor cell lines derived from lung cancer, melanoma, ovarian cancer, breast cancer, and leukemia [169]. Similarly, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 are chemokines that play a key role in immune and inflammatory responses by promoting the recruitment and activation of different leukocyte subpopulations. These chemokines bind to the CXCR3 receptor; however, other binding and phosphorylation sites can be stimulated by these cytokines and therefore represent potential therapeutic targets [171, 172]. TNF- α antagonists may inhibit the production of cytokines and chemokines that are involved in the recruitment of inflammatory cells, angiogenesis, and the degradation of the extracellular matrix [173]. Because TNF- α is involved in tumor growth in cell lines and mouse models, its neutralization in cancer patients may be beneficial [174]. It is believed that the TNF- α antagonists used in cancer treatment can modulate the function of regulatory T cells and reduce the inflammatory response in Th17 cells [175]. Anti-TNF- α antibodies, such as infliximab [176], etanercept, and adalimumab [177], are currently being tested in clinical trials. However, even after the optimization of these antibodies for human use, two problems remain: difficult dosing schedules

associated with the mode of drug administration and the high cost of treatment. The search for alternative therapeutic tools is ongoing. One promising candidate is oleandrin (UNBS1450), a cardiotonic glycoside obtained from *Nerium oleander* that is able to block TNF- α in a variety of cells, such as U937 cells, CaCOV3 human ovarian cells, HeLa cells, and Jurkat cells [172].

IL-6, a Ras effector, is another tumor promoter that has been implicated in several human cancers, including multiple myeloma and hepatocellular carcinoma [173]. IL-6 blocks apoptotic signals and induces the expression of genes that promote cellular proliferation and angiogenesis in the tumor microenvironment [178]. Several trials are underway to test antibodies that act against IL-6 and its receptor. Siltuximab (CNTO 328) is one such drug that can neutralize the function of IL-6 and reduce the incidence of various cancers, including lymphoma, myeloma, and kidney cancer [174].

Because NF- κ B plays a critical role in both tumorigenesis and the induction of tumor cell resistance to currently available therapy, inhibitors of these pathways have enormous potential [175, 179, 180]. Several NF- κ B inhibitors have been developed either by rational design or from natural products [181]. NF- κ B can be inhibited by a variety of compounds including: STAT3 inhibitors, IKK inhibitors, JAK2 inhibitors, and natural compounds and their derivatives [162]. Triterpenoids, synthetic derivatives of oleanolic acid and ursolic acid, such as 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), its C-28 methyl ester (CDDO-Me), and the C28 imidazole derivative (CDDO-Im), are potent anti-inflammatory [182] and antitumor agents [183] that belong to the class of natural compounds and their derivatives. The inhibition of NF- κ B signaling appears to be an essential molecular mechanism underlying the therapeutic effects of CDDO and its derivatives [184].

Other IKK inhibitors, such as thalidomide and its analogues, that have been classified as immunomodulatory drugs have shown promising results in the treatment of multiple myeloma [185]. Arsenic trioxide (As_2O_3) is a metalloid that has been used as antitumor agent against promyelocytic leukemia and solid tumors in clinical trials. As_2O_3 has been shown to inhibit IKK by binding to cysteine-179 and activating a loop of the catalytic subunit of the enzyme [181].

Knowledge of the correlation between inflammation and tumor development offers the possibility of developing new and novel candidates for therapeutic interventions to be used in combination with conventional therapeutic approaches, such as chemotherapy, radiotherapy, and targeted therapy [182].

Conclusion

The most important difference between the pursuit of so-called classical cytotoxic agents and targeted agents is that

classical cytotoxic agents seek to promote tumor cell death, whereas in targeted therapy, cell death is produced indirectly by the action of the drug on a particular target. Because the activation and control pathways of tumor cells generally overlap, a therapeutic agent acts on several pathways at the same time. For this reason, it is very difficult to classify drugs according to a characteristic process. For most molecular targets and drug discovery strategies, the ten characteristics described in this review (and sometimes the targeted pathways) are considered separately in primary drug screening. A system in which drugs are categorized according to their targets and pathways (while considering the differences between tumor cells and normal cells of a given tissue) would likely prove to be more effective than the currently used method of drug classification. Such a strategy could fulfill Farber's 50-year-old cherished dream of developing effective and safe drugs against cancer.

Acknowledgments This work was partially supported through funding from the SENESCYT and Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador.

Conflicts of interest None

References

- Collins I, Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2006;2:689–700.
- Eastman A, Perez R. New targets and challenges in the molecular therapeutics of cancer. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;62:5–14.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646–74.
- J.A. Engelman. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Cancer.* 9 (2009).
- Nardella C, Carracedo A, Alimonti A, Hobbs RM, Clohessy JG, Chen Z, et al. Differential requirement of mTOR in postmitotic tissues and tumorigenesis. *Sci Signal.* 2009;2:ra2.
- Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:1851–63.
- Zaytseva YY, Valentino JD, Gulhati P, Evers BM. mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2012;319:1–7.
- S. Pyndiah, S. Tanida, K.M. Ahmed, E.K. Cassimere, C. Choe, D. Sakamuro. c-MYC suppresses BIN1 to release poly(ADP-ribose) polymerase 1: a mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance. *Sci. Signal.* 4 (2011) ra19.
- Larsson L-G, Henriksson MA. The yin and yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res.* 2010;316:1429–37.
- Lu X, Pearson A, Lunec J. The MYCN oncoprotein as a drug development target. *Cancer Lett.* 2003;197:125–30.
- Lee MO, Han SY, Jiang S, Park JH, Kim SJ. Differential effects of retinoic acid on growth and apoptosis in human colon cancer cell lines associated with the induction of retinoic acid receptor beta. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:485–96.
- Sarkar SA, Sharma RP. Expression of c-Myc and other apoptosis-related genes in Swiss Webster mouse fetuses after maternal exposure to all trans-retinoic acid. *Reprod Toxicol.* 2002;16:245–52.
- Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Morse EM, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature.* 2010;468:1067–73.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell.* 2011;146:904–17.
- Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2011;478:524–8.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274:1672–7.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36:131–49.
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle. CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:153–66.
- Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:910–7.
- Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:547–66.
- Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5:366–73.
- Woyach JA, Lozanski G, Ruppert AS, Lozanski A, Blum KA, Jones JA, et al. Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia.* 2012;26:1442–4.
- Cirillo D, Pentimalli F, Giordano A. Peptides or small molecules? Different approaches to develop more effective CDK inhibitors. *Curr Med Chem.* 2011;18:2854–66.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16:3–11.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456–62.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516.
- Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:876–85.
- Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis.* 2001;6:191–7.
- Holoch PA, Griffith TS. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *Eur J Pharmacol.* 2009;625:63–72.
- Ghobrial I, Witzig T, Adjei A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:178–94.
- van Geelen CM, Pennarun B, Le PT, de Vries EG, de Jong S. Modulation of TRAIL resistance in colon carcinoma cells: different contributions of DR4 and DR5. *BMC Cancer.* 2011;11:39.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770–6.
- Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:724–37.
- Wiman KG. Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ.* 2006;13:921–6.
- Lu P, Yang X, Huang Y, Lu Z, Miao Z, Liang Q, et al. Antitumor activity of a combination of rAd2p53 adenoviral gene therapy and radiotherapy in esophageal carcinoma. *Cell Biochem Biophys.* 2011;59:147–52.

37. Partridge M, Costea DE, Huang X. The changing face of p53 in head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36:1123–38.
38. Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z. From the cover: small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Med Sci.* 2006;103:188–1893.
39. Fischer U, Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 1:942–61.
40. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood.* 2005;106:408–18.
41. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004;303:844–8.
42. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:121–32.
43. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 2006;13:1378–86.
44. Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:989–1000.
45. Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res.* 2007;13:7254–63.
46. M.H. Kang, C.P. Reynolds. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy targeting mitochondrial apoptotic pathways. *Clin. Cancer Res.* (2009) 1126–1132.
47. Hann CL, Daniel VC. E. a Sugar, I. Dobromilskaya, S.C. Murphy, L. Cope, et al. Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68:2321–8.
48. Kabore AF, Johnston JB, Gibson SB. Changes in the apoptotic and survival signaling in cancer cells and their potential therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004;4:147–63.
49. D'Amelio M, Tino E, Cecconi F. The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm Res.* 2008;25:740–51.
50. Yang J-Y, Michod D, Walicki J, Widmann C. Surviving the kiss of death. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1027–31.
51. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:61–70.
52. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:553–62.
53. Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Curr Oncol Rep.* 2012;14:120–8.
54. Altieri DC. Targeting survivin in cancer. *Cancer Lett.* 2013;332:225–8.
55. R. Arora, M. Shuda, A. Guastafierro, H. Feng, T. Toptan, Y. Tolstov, et al. Survivin is a therapeutic target in Merkel cell carcinoma. *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 133ra56.
56. Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao J, Yang J-M. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31:1154–64.
57. K.-D. Yu, Z.-M. Shao. The two faces of autophagy and the pathological underestimation of DCIS. *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 618; author reply 618.
58. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 2009;16:87–93.
59. Liu B, Wen X, Cheng Y. Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell Death Dis.* 2013;4:e892.
60. Kubisch J, Türei D, Földvári-Nagy L. Z. a Dunai, L. Zsákai, M. Varga, et al. Complex regulation of autophagy in cancer—integrated approaches to discover the networks that hold a double-edged sword. *Semin Cancer Biol.* 2013;23:252–61.
61. Hayflick L. The strategy of senescence. *Gerontol.* 1974;14:37–45.
62. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt S, Chiu C, Morin G, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998;279:349–52.
63. Guittat L, Alberti P, Gomez D, De Cian A, Pennarun G, Lemarteleur T, et al. Targeting human telomerase for cancer therapeutics. *Cytotechnology.* 2004;45:75–90.
64. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:167–79.
65. Djojotubroto MW, Chin AC, Go N, Schaetzlein S, Manns MP, Gryaznov S, et al. Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology.* 2005;42:1127–36.
66. Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW. Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;96:73–81.
67. Shay JW, Keith WN. Targeting telomerase for cancer therapeutics. *Br J Cancer.* 2008;98:677–83.
68. Weiner L, Surana R, Wang S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:317–27.
69. Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev.* 2012;5:444–56.
70. Herbert BS. Disruption of telomere homeostasis as a new cancer treatment strategy. *Memo - Mag. Eur Med Oncol.* 2009;2:21–4.
71. Bochman ML, Paeschke K. V. a Zakian. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet.* 2012;13:770–80.
72. Kim M-Y, Vankayalapati H, Shin-ya K, Wierzbka K, Hurley LH. Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J Am Chem Soc.* 2002;124:2098–9.
73. Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ. J. a Double, et al. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res.* 2005;65:1489–96.
74. Leonetti C, Scarsella M, Riggio G, Rizzo A, Salvati E, D'Incalci M, et al. G-quadruplex ligand RHPS4 potentiates the antitumor activity of camptothecins in preclinical models of solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7284–91.
75. Chen Y, Qu K, Zhao C, Wu L, Ren J, Wang J, et al. Insights into the biomedical effects of carboxylated single-wall carbon nanotubes on telomerase and telomeres. *Nat Commun.* 2012;3:1074.
76. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:274–84.
77. Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:55–63.
78. Palmieri D, Halverson DO, Ouatas T, Horak CE, Salerno M, Johnson J, et al. Medroxyprogesterone acetate elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor expression in hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:632–42.
79. Smith SC, Theodorescu D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:253–64.
80. El Touny L, Banerjee P. Genistein induces the metastasis suppressor kangai-1 which mediates its anti-invasive effects in TRAMP cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361:169–75.
81. Xu J-H, Guo X-Z, Ren L-N, Shao L-C, Liu M-P. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14:1126–32.
82. Bstresing V, Daubiné F, Benzaid I, Mönkkönen H, Clézardin P. Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2007;257:16–35.
83. Matos MA, Tannuri U, Guarniero R. The effect of zoledronate during bone healing. *J Orthop Traumatol.* 2010;11:7–12.
84. Wu L, Zhu L, Shi W-H, Zhang J, Ma D, Yu B. Zoledronate inhibits the proliferation, adhesion and migration of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2009;602:124–31.
85. Hynes NE. H. a Lane. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:341–54.
86. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene.* 2000;19:6550–65.

87. Weigelt B, Peterse JL, L.J. van 't Veer. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:591–602.
88. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:463–75.
89. Weinberg RA. Perspectives in cancer research oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*. 1989;49:3713–21.
90. Baguley B. Antivascular therapy of cancer: DMXAA. *Lancet Oncol*. 2003;4:141–8.
91. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:727–39.
92. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008;8:880–7.
93. Grothey A, Galanis E. Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:507–18.
94. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J. R. a Smith, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:835–44.
95. Ronca R, Sozzani S, Presta M, Alessi P. Delivering cytokines at tumor site: the immunocytokine-conjugated anti-EDB-fibronectin antibody case. *Immunobiology*. 2009;214:800–10.
96. Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:436–46.
97. Heath VL, Bicknell R. Anticancer strategies involving the vasculature. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:395–404.
98. Reinacher-Schick A, Pohl M, Schmiegel W. Drug insight: antiangiogenic therapies for gastrointestinal cancers—focus on monoclonal antibodies. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5:250–67.
99. Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev*. 2009;8:313–31.
100. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438:967–74.
101. Legg JA, Herbert JMJ, Clissold P, Bicknell R. Slits and roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis*. 2008;11:13–21.
102. Koch AW, Mathivet T, Larrivée B, Tong RK, Kowalski J, Pibouin-Fragner L, et al. Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev Cell*. 2011;20:33–46.
103. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:220–8.
104. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10:789–99.
105. Guaman-Ortiz LM, Giansanti V, Dona F, Scovassi I. Pharmacological effects of PARP inhibitors on cancer and other diseases. *Curr Enzym Inhib*. 2011;7:244–58.
106. Davar D, Beumer J, Hamieh L, Tawbi H. Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr Med Chem*. 2012;19:3907–21.
107. Drew Y, Plummer R. PARP inhibitors in cancer therapy: two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications. *Drug Resist Updat*. 2009;12:153–6.
108. Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:421–40.
109. Annunziata C, O'Shaughnessy J. PARP as a novel therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;16:4517–26.
110. Begg AC. F. a Stewart. C. Vens. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:239–53.
111. Davidson D, Wang Y, Wang R, Aloyz L, Panasci. The PARP inhibitor ABT-888 synergizes irinotecan treatment of colon cancer cell lines. *Invest. New Drugs*. (2013) 1–8.
112. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481:287–94.
113. Ekblad T, Camaioni E, Schüller H, Macchiarulo A. PARP inhibitors: polypharmacology versus selective inhibition. *FEBS J*. 2013;280:3563–75.
114. Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cancer. *Front Oncol*. 2013;3:1–11.
115. Do K, Chen A. Molecular pathways: targeting PARP in cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2013;19:977–84.
116. Nijman SMB, Friend SH. Potential of the synthetic lethality principle. *Science*. 2013;342:809–11.
117. De Lorenzo SB, Patel AG, Hurley RM, Kaufmann SH. The elephant and the blind men: making sense of PARP inhibitors in homologous recombination deficient tumor cells. *Front Oncol*. 2013;3:228.
118. Banerjee S, Kaye SB, Ashworth A. Making the best of PARP inhibitors in ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:508–19.
119. Reinbolt RE, Hays JL. The role of PARP inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies. *Front Oncol*. 2013;3:237.
120. Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 2006;21:3–9.
121. Matsuoka S. B. a Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, K.E. Hurov, J. Luo, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007;316:1160–6.
122. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B. R. a Sharma. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:193–204.
123. Yang D, Halaby M, Li Y, Hibma JC, Burn P. Cytoplasmic ATM protein kinase: an emerging therapeutic target for diabetes, cancer and neuronal degeneration. *Drug Discov Today*. 2011;16:332–8.
124. A. Nadkarni, M. Shrivastav, A.C. Mladek, P.M. Schwingler, P.T. Grogan, J. Chen, et al. ATM inhibitor KU-55933 increases the TMZ responsiveness of only inherently TMZ sensitive GBM cells. *J. Neurooncol*. (2012).
125. Rainey M, Charlton M, Stanton R, Kastan M. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2008;68:7466–74.
126. Fukasawa K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:911–24.
127. Kops GJPL. B. a a Weaver, D.W. Cleveland. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:773–85.
128. Zhivotovsky B, Kroemer G. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:752–62.
129. Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Gandara DR. Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1639–48.
130. Kitzen JJEM. M.J. a de Jonge, J. Verweij. Aurora kinase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;73:99–110.
131. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. 2004;10:262–7.
132. Keen N, Taylor S. Mitotic drivers—inhibitors of the Aurora B kinase. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:185–95.
133. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:762825.
134. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:685–98.
135. Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer*. 2002;87:805–12.
136. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:447–64.
137. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the “Warburg effect” and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009;19:17–24.
138. Cohen S, Flescher E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry*. 2009;70:1600–9.

139. Raviv Z, Cohen S, Reischer-Pelech D. The anti-cancer activities of jasmonates. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71:275–85.
140. Vander Heiden M, Christofk H, Schuma E, Subtelnly AO, Sharfi H, Harlow E, et al. Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. *Biochem Pharmacol.* 2010;79:1118–24.
141. Dang CV, Hamaker M, Sun P, Le A, Gao P. Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med.* 2011;89:205–12.
142. Goldberg MS. P. a Sharp. Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *J Exp Med.* 2012;209:217–24.
143. Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, Hu X. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene.* 2011;30:4297–306.
144. Iqbal MA, Bamezai RNK. Resveratrol inhibits cancer cell metabolism by down regulating pyruvate kinase M2 via inhibition of mammalian target of rapamycin. *PLoS One.* 2012;7:e36764.
145. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:85–95.
146. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:2037–42.
147. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science.* 2004;305:200–5.
148. Sharma SV, Settleman J. Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and “oncogenic shock”. *Biochem Pharmacol.* 2010;80:666–73.
149. Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:83–117.
150. Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:613–25.
151. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev.* 2008;208(222):206–21.
152. Prendergast GC. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene.* 2008;27:3889–900.
153. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:237–51.
154. Yared J, Kimball A, Baer MR, Bahrain H, Auerbach M. Rituximab maintenance therapy until progression after rituximab and chemotherapy induction in patients with follicular lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13:253–7.
155. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:317–27.
156. A.E. Moran, M. Kovacovics-Bankowski, A.D. Weinberg. The TNFRs OX40, 4–1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* (2013) 1–8.
157. Advani R, Forero-Torres A, Furman RR, Rosenblatt JD, Younes A, Ren H, et al. Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin’s lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:4371–7.
158. Houot R, Kohrt H, Goldstein MJ, Levy R. Immunomodulating antibodies and drugs for the treatment of hematological malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30:97–109.
159. Peggs KS. S. a Quezada, C. a Chambers, A.J. Korman, J.P. Allison. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med.* 2009;206:1717–25.
160. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140:883–99.
161. Fried B, Reddy A, Mayer D. Helminths in human carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2011;305:239–49.
162. Aggarwal BB. R. V Vijayalekshmi, B. Sung. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res.* 2009;15:425–30.
163. Kundu J, Surh Y. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. *Mutat Res.* 2005;591:123–46.
164. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:349–61.
165. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011;96:27–36.
166. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:181–93.
167. Cuzick J, Otto F. J. a Baron, P.H. Brown, J. Burn, P. Greenwald, et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol.* 2009;10:501–7.
168. Ben-Baruh A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol.* 2006;16:38–52.
169. Galzi J-L, Hachet-Haas M, Bonnet D, Daubeuf F, Lecat S, Hibert M, et al. Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther.* 2010;126:39–55.
170. Trotta T, Costantini S, Colonna G. Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: putative target for new drug design. *Mol Immunol.* 2009;47:332–9.
171. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:361–71.
172. Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14:45–55.
173. Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:i104–8.
174. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012;38:904–10.
175. Shen H-M, Tergaonkar V. NF κ B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis.* 2009;14:348–63.
176. Brown ER. K. a Charles, S. a Hoare, R.L. Rye, D.I. Jodrell, R.E. Aird, et al. A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF- α inhibitor, in patients with advanced cancer. *Ann Oncol.* 2008;19:1340–6.
177. Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Ben Amor N. TNF- α and its inhibitors in cancer. *Med Oncol.* 2010;27:185–98.
178. Balkwill F, Mantovani A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87:401–6.
179. Olivier S, Robe P, Bours V. Can NF- κ B be a target for novel and efficient anti-cancer agents? *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1054–68.
180. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:297–309.
181. Emadi A, Gore SD. Arsenic trioxide—an old drug rediscovered. *Blood Rev.* 2010;24:191–9.
182. Coussens LM, Zitvogel L. a. K. Palucka. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science.* 2013;339:286–91.
183. Petronelli A, Pannitteri G, Testa U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs.* 2009;20:880–92.
184. Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:2979–99.
185. J. Shortt, a K. Hsu, R.W. Johnstone. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene.* (2013) 1–12.

Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition

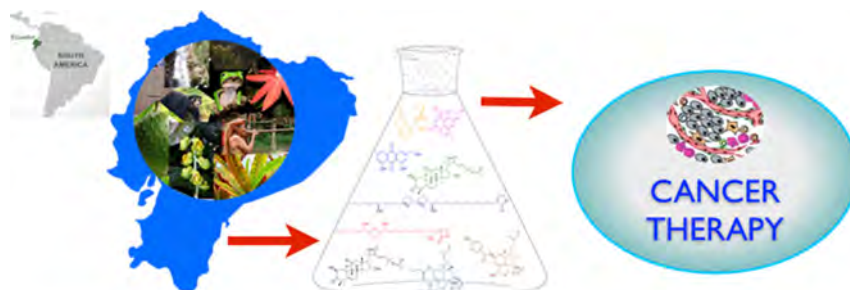
Natalia Bailon-Moscoso · Juan Carlos Romero-Benavides ·
Fani Tinitana-Imaicela · Patricia Ostrosky-Wegman

Received: 1 September 2014 / Accepted: 30 January 2015 / Published online: 6 February 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Ecuador is well known for its biodiversity and its ancient richness. This review provides an overview of Ecuadorian plant species in terms of the ethnobotany and chemistry of natural products in relation to anticancer activity. Plant species were classified into two groups: (a) Ethnomedical species with confirmed antitumor activity and (b) species indigenous to Ecuador with anti-

cancer potential. This review shows that there is a great chemical diversity in Ecuadorian plants that can be used for potential antitumor therapeutics, and chemical and biological analysis confirms the biomedical use of the plant-derived compounds as cytotoxic agents for cancer cells.

Graphical Abstract



N. Bailon-Moscoso · P. Ostrosky-Wegman
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional
Autónoma de México (UNAM), México, DF, Mexico

N. Bailon-Moscoso (✉)
Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica
Clínica, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad
Técnica Particular de Loja (UTPL), San Cayetano alto s/n, Loja
CP: 1101608, Ecuador
e-mail: ncbailon@utpl.edu.ec

J. C. Romero-Benavides
Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de
Loja (UTPL), Loja, Ecuador

F. Tinitana-Imaicela
Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica
Particular de Loja (UTPL), Loja, Ecuador

Keywords Anticancer · Ecuador · Plant ·
Ethnomedicine · Ethnobotany

Introduction

Currently, there are many curative and palliative treatments for cancer allowing to eradicate tumor cells; among them are chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy, and even gene therapy (Weissleder and Pittet, 2008). During chemotherapy, the application of a series of chemical compounds, either natural or synthetic, lead to induction of cell death or cell cycle arrest in tumor cells. These anticancer chemical compounds can be used alone or more often in combination with other chemicals or non-chemical regimens. Secondary metabolites isolated

from microorganisms, plants, and marine species, among others, have been important sources of bioactive substances potentially with anticancer abilities (Cragg *et al.*, 2009). Approximately 66 % of the FDA-approved drugs for cancer treatment are secondary metabolites or are semi-synthetic or synthetic analogs based on pharmacophores obtained from secondary metabolites (Cragg and Newman, 2013).

The production of secondary metabolites is favored by a diverse microenvironment. There are approximately 20,000 various plant species, 20 % of which are endemic, were found in Ecuador (Gupta, 2001). Continental Ecuador is the region with the third highest density of endemic plant species worldwide (Joppa *et al.*, 2013). And this is a country in which the plant species with the highest cytotoxic activity against human cancer cells can be found, compared to other countries with similar biological diversity, such as Indonesia, Dominican Republic, Thailand, and Peru (Balunas *et al.*, 2006). Another important feature of Ecuador is the ethnomedical knowledge of many indigenous communities. In this article, we will review many plant species, their ethnomedical information, active molecules isolated from them, and research studies that validate their potential anticancer effectiveness. For this purpose, we have classified them into two large groups: Ethnomedical species with informed antitumor activity and species indigenous to Ecuador with anticancer potential.

Ethnomedical species with informed antitumor activity

Many studies have reported the use of existing plant species against cancer by ethnic groups in Ecuador, many of which are shown in Table 1. Some of these species are endemic to Ecuador; however, regional and worldwide species are also included. The compositions of the chemicals derived from these plant species are described in Table 2. Antitumor activity has been studied either with extracts or with isolated metabolites and is shown in Fig. 1.

Uncaria tomentosa (Will.) DC

This plant is a native liana from Ecuador, distributed along the coast and in the Amazon rainforest. Its populations have been found in the Napo, Orellana, Sucumbíos, and Zamora Chinchipe provinces at altitudes from 0 to 900 meters above sea level (m.a.s.l.) (de la Torre *et al.*, 2008). This plant is also known as a “cat’s claw”, with distribution in South America and Asia. It used as a traditional medicine by Ecuadorian (Tene *et al.*, 2007) (Pohle and Reinhardt, 2004) Peruvian, and Bolivian indigenous people (Bourdy *et al.*, 2000), as well as by the Asian population to treat warts, ulcers, headaches, intestinal problems, fungal

and bacterial infections (Heitzman *et al.*, 2005). The *U. tomentosa* organic extracts contain active secondary metabolites such as oxindole alkaloids, proanthocyanidins, triterpenes, sterols, and flavonoids. The oxindole alkaloids include isopteropodine (1), isomitraphylline (2), pteropodine (3), and uncarine F (4), all of which exhibit cytotoxic activity against the acute lymphoblastic leukemia cells (CCRF-CEM-C7H2 T-ALL cell line) (Bacher *et al.*, 2006). In addition, pteropodine and uncarine F are capable of inducing apoptosis (Bacher *et al.*, 2006). Although mitraphylline (5) failed to exhibit cytotoxicity against the CCRF-CEM-C7H2 T-ALL cells (Bacher *et al.*, 2006), it displayed a cytotoxic activity in human glioma and neuroblastoma cell lines with an IC₅₀ between 12 and 40 μM (García Prado *et al.*, 2007). However, isopteropodine and pteropodine alkaloids inhibit the growth of medullary thyroid carcinoma (MTC-SK) cells and induce caspase-mediated apoptosis (Rinner *et al.*, 2009). In in vivo mouse models, various organic extracts and *U. tomentosa* alkaloid-enriched extracts induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells (HL-60 cell line) (Sheng *et al.*, 2000) (Cheng *et al.*, 2007) (Pilarski *et al.*, 2013) (De Martino *et al.*, 2006) (Pilarski *et al.*, 2010). Additionally, the alkaloid-enriched extracts inhibit the growth of xenografts of cervical cancer (HeLa cell line) and colon cancer (HCT116 and SW480 cell lines) by affecting the WNT signaling pathway (Gurrola-Díaz *et al.*, 2011). Sheng *et al.* reported that the aqueous extracts of this plant induce cytotoxicity via apoptosis in the human leukemia cell lines HL-60 and K-562 (Sheng *et al.*, 2000). Another example is quinovic acid glycosides, which were isolated using the ethanol:water extraction and shown to inhibit the growth of human T24 bladder cancer cells (at the IC₅₀ of 78,36 μg/mL) by activating the caspase-3-dependent apoptotic pathway and translocation of NF-κB to the nucleus (Dietrich *et al.*, 2014). Moreover, many studies show the anti-inflammatory activity presented in extracts of this species as well as by its components, which could assist in preventing and potentiating the effect against tumor cells by stimulating the immune system (Allen-Hall *et al.*, 2010) (Heitzman *et al.*, 2005).

Croton lechleri Mull. Arg

Belonging to the Euphorbiaceae family, in Ecuador, this plant is widely distributed in the Andes and the Amazon rainforest, especially in Carchi, Esmeraldas, Loja, Morona-Santiago, Napo, Orellana, Pastaza, Sucumbios, Tungurahua, and Zamora Chinchipe provinces at altitudes from 0 to 2,000 m.a.s.l. (de la Torre *et al.*, 2008). *Croton* is a traditional medicinal plant that produces a red sap known as “Dragon’s blood”, obtained by carving the bark of two- and three-year-old plants or older (Salatino *et al.*, 2007). The

Table 1 Ethnomedical species with confirmed antitumor activity

Family	Scientific name	Common name	Part used	Reference
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill	Hinojo, anís, eneldo, hinojo común	Leaf, flower	Tene <i>et al.</i> (2007)
Apocynaceae	<i>Prestonia mollis</i> Kunth	Bejuco del Cáncer; Arachillas, betilla, falso condurango, sánalo todo, malacapa	Root, stem, leaf	Tene <i>et al.</i> (2007)
Apocynaceae	<i>Marsdenia condurango</i> Rchb. f.	Condurango	bark, leaf	Tene <i>et al.</i> (2007)
Asteraceae	<i>Aristeguietia glutinosa</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob	Matico; <i>Chusa lunku</i> , <i>Hierba del soldado</i> , <i>Matico silvestre</i> , <i>Melga</i> , <i>Migla</i>	leaf	Cerón (2006)
Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	Monte del aire; Chukri yuyu, paki panka, pichi panka, raku panka (kichwa) llaga panka, sebachuccaque (áingae), jéye, soma éco (pai coca), koyobimo (Wao tededo), espíritu santo, hojas del aire, chigriyuyo, tomalillo	Stem, leaf	Tene <i>et al.</i> (2007)
Crassulaceae	<i>Echeveria quitensis</i> (Kunth.) Lindl.	Condorcol; siempre viva; cundur cul	Leaf	Tene <i>et al.</i> (2007)
Equisetaceae	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Caballo chupa; Sukillu, cola de caballo, hierba platero, tubakavache	Stem	Cerón (2006)
Euphorbiaceae	<i>Croton lechleri</i> Mull. Arg	Sangre de drago, Tulan wiki, tulan yura, yawar kspi, yawar wiki, yawar wiki panka (Kichwa), sacha tucufais; masujin (áingae), ao yéhui (pai coca), koñiwe, koyibe (wao tededo), urúchmas (shuar chicham), uruch numi (achuar chicham), hoja de sangre, resina de sangre, sulsul, tupic.	Latex	Graham <i>et al.</i> (2000)
Fabaceae	<i>Crotalaria sp.</i> L.	Fenogreco	leaf	Tene <i>et al.</i> (2007)
Fabaceae	<i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms	Chaquino; bálsamo kara, sesepëquësoquë (pai coca), yemenga tanoe (Wao tededo), chikawinia (shuar chicham), chikiáiniua, kaip (achuar chicham), bálsamo del Perú, corteza de bálsamo, isturaki	Bark	Tene <i>et al.</i> (2007)
Fabaceae	<i>Senna multiglandulosa</i> (Jacq.) H.S. Irwin & Barneby	Chinchín		Cerón (2006)
Malvaceae	<i>Lavatera arborea</i> L.	Malva; Puka malva, malva blanca	Stem, bark	Cerón (2006)
Olacaceae	<i>Minquartia guianensis</i> Aubl.	Wayakan chi, yatuytya, chi jaki (cháíki), wanpula, yura wanpula (kichwa), señámba quini cco,tsindócho (áingae), yaji siu (pai coca), kayeyakawe, kobakadetapo, kobakadewe (wao tededo), paini (shuar chicham), cuayacán, palo de barbasco	bark	El-Seedi <i>et al.</i> (2008)
Polygalaceae	<i>Monnina obtusifolia</i> H.B.K.	Iwilan (kichwa), reloj de campo, sagitaria	Aerial parts	Cerón (2006)
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	Níspero; <i>Níspero del Japón</i> , <i>Míspero</i>	Leaf	Cerón (2006)
Rubiaceae	<i>Uncaria tomentosa</i> (Will.) DC	Uña de gato; eygawe (wao tededo), kenkuk (shuar chicham)	Bark	Tene <i>et al.</i> (2007)

Amazon indigenous people use this sap for wound healing and to treat gastro-intestinal diseases and cancer (Cerón, 2006; Gupta *et al.*, 2008). The sap (at 1 mg/ml) has been able to inhibit the proliferation of K562 myeloid leukemia cells (Rossi *et al.*, 2003) and SK23 melanoma cells (Rossi *et al.*, 2003). At concentrations 10-fold higher, it inhibits the growth of HT-29 colon cancer cells and the LoVo colon cancer cells (Montopoli *et al.*, 2012). Using confocal microscopy, it was observed that *Croton lechleri* sap at 1 mg/

mL causes a loss of the microtubular structure in SK23 melanoma cells (Montopoli *et al.*, 2012). The phytochemical characterization of the sap has led to the conclusion that the oligomeric proanthocyanidins and flavonols constitute almost 90 % of the dry weight. However, one of flavonoids most studied in this species is the SP-303. This flavonoid is known for its antiviral and antidiarrheal activity but has no cytotoxic activity in tumor cells (Jones, 2003). Unlike the SP-303, other catechins present in the sap of *C. lechleri*

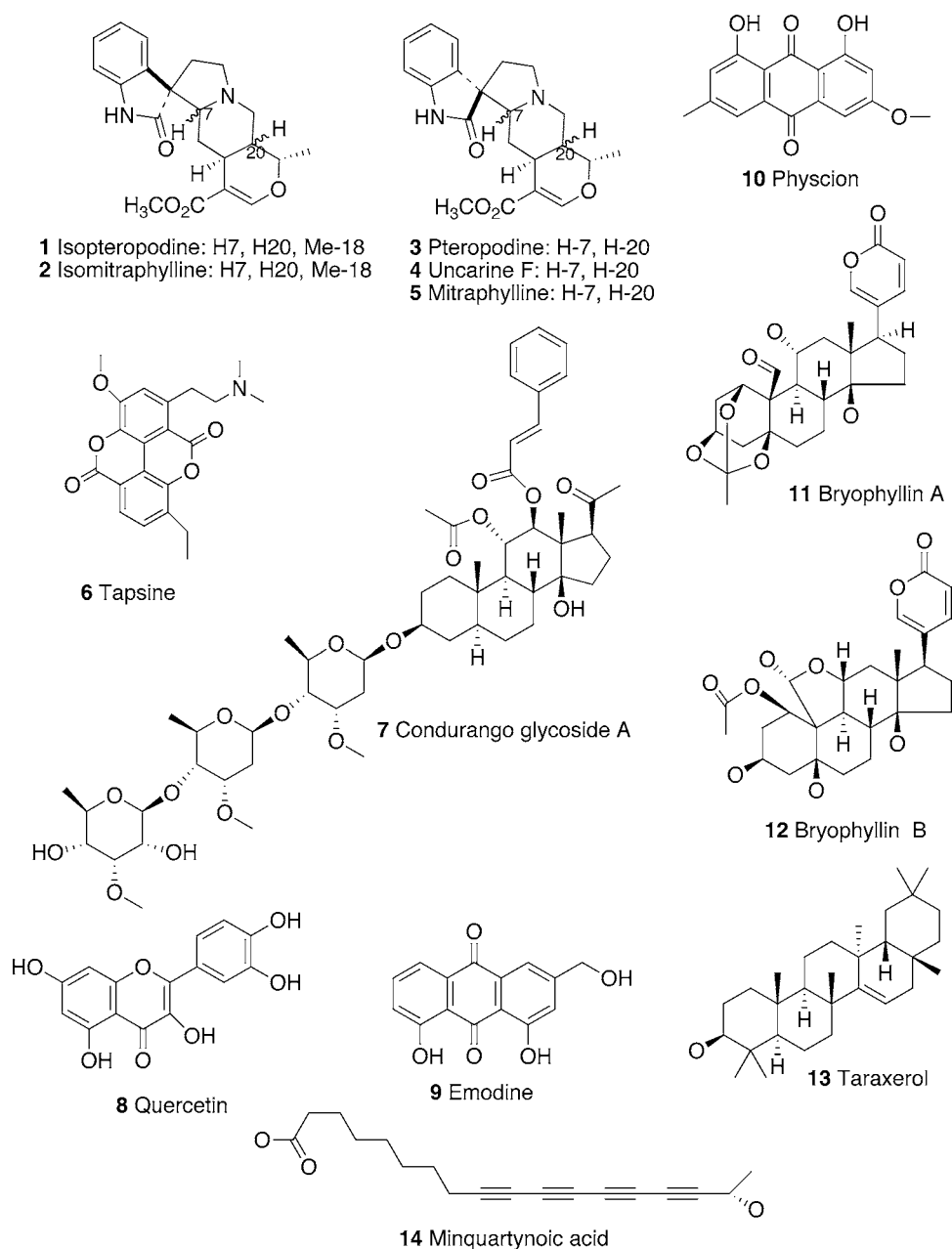


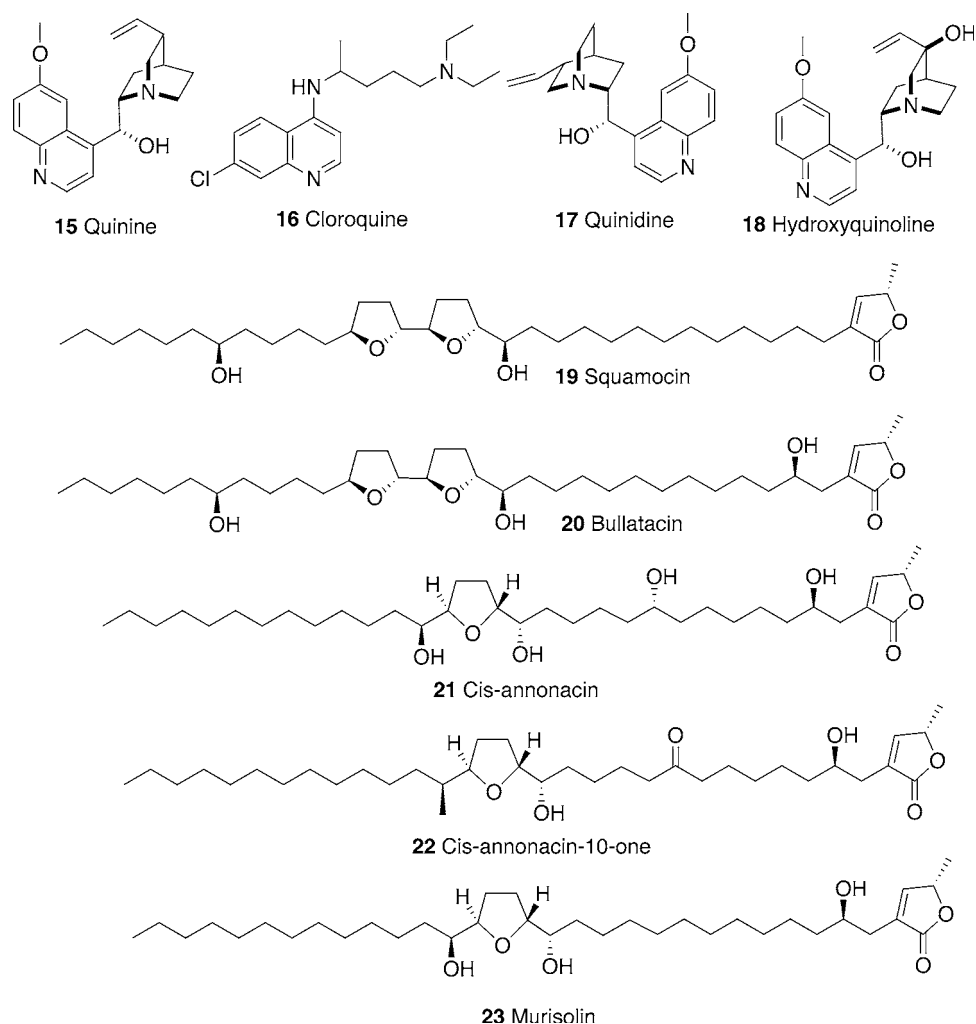
Fig. 1 Structures 1 to 14

(catechin, gallocatechin, epicatechin, epigallocatechin) have been extensively studied with human cancer cells. They were shown to display in vitro cytotoxicity, as well as inhibited cell proliferation, induced of apoptosis, activated caspases, inhibited protein kinases and modulated cell cycle regulation (Fujiki *et al.*, 2002; Forester and Lambert, 2014). Clerodane-type diterpenes such as korberin A and korberin B have been also isolated (Cai *et al.*, 1993). An alkaloid called taspine (6) has been found in small amounts and also present in other plants such as *Radix and Rhizoma leonticis*. It has been shown that taspine inhibits the proliferation of SK-23 melanoma cells and HT29 colon carcinoma cells (Montopoli

et al., 2012). Taspine can also inhibit the proliferation of A431 epidermoid carcinoma cells and induce caspase-3 activation and regulation of the Bax/Bcl-2 ratio leading to cell death through apoptosis (Montopoli *et al.*, 2012). Taspine and its certain derivatives can significantly inhibit the cell proliferation of human umbilical vein endothelial cells induced by the vascular endothelial growth factor, which is crucial for angiogenesis (Zhang *et al.*, 2010). Additionally, its derivative HMQ1611 has a cytotoxic effect on ZR-75-30, MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231 breast cancer cells and in xenografts in mice. HMQ1611 shows a marked inhibiting effect on breast cancer cells, apparently through the

Table 2 Composition chemical of species indigenous to Ecuador with anticancer potential

Scientific name Parte used	Metabolites secondary isolated	Reference
<i>Croton lechleri</i> Mull. Arg Sap Bark Leaves	Taspine; 3', 4-O-dimethylcedrusin; procyanidin B-1 and B-4; catechin; epigallocatechin; epicatechin; gallocatechin; (4- α -8)-gallocatechin; (4- α -6) gallocatechin; (4- α -6)-epigallocatechin; (4- α -8)-epicatechin; (4- α -8)-epigallocatechin; bincatriol; crolechinel; crolechic acid; hardwickiic acid; koberins A and B; korberin B; 4-O-methylcedrusin; SP-303; blumenol B and C; 4,5-dihydroblumenol A Bincatriol; crolechinel; crolechic acid; hardwickiic acid; and koberins A and B β -sitosterol- β -D-glucopyranoside; β -sitosterol Sinoacutine; glaucine; isoboldine; and thaliporphine	Cai <i>et al.</i> (1993), Gupta <i>et al.</i> (2008), Jones (2003), De Marino <i>et al.</i> (2008), Salatino <i>et al.</i> (2007)
<i>Marsdenia condurango</i> Rchb. f. Bark	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; vanillin; vanillaldehyde; 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; 4-coumarate; p-coumaric acid; trans-4-hydroxycinnamate; trans-p-hydroxycinnamate; 4-hydroxycinnamic; chlorogenate; chlorogenic acid; caffeoylquinic acid; trans-5-O-caffeoyl-D-quinat; caffeate; caffeic acid; 3,4-dihydroxycinnamic acid; quercitrin; quercetin 3-L-rhamnoside; quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside; rutin; 3-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5 coumarin; coumarine; coumarin; 2H-1-benzopyran-2-one; 1,2-benzopyrone; 2-propenoic acid; 3-(2-hydroxy) saponarin; isovitexin-7-O-beta-D-glucopyranoside; cichoriin; esculetin; aesculetin; umbelliferone; 7-hydroxycoumarin; hyperin; quercetin 3-galactoside; kaempferol-3-O-galactoside; kaempferol 3-O-beta-D-galactoside; trifolin; neochlorogenic acid; trans-neochlorogenic acid; neochlorogenate; condurango glycoside A and C; condurangogenin C; condurangogenin A; condurango glycoside A0; condurango glycoside C; condurangin	Kanehisa Labs (2015)
<i>Minuartia guianensis</i> Aubl. Leaves Bark	Squalene; lupen-3-one; taraxerol; lupeol; taraxer-3-one; oleanolic acid; 3 β -methoxy-lup-20(29)-ene Lichexanthone; 17-hydroxy-9,11,13,15-octadecatetraenoic acid; 7-deoxyloganic acid; betulin 20-(29)-lupen-3,28-diol; 13,28-epoxy-3-acetoxy-11-oleanane; minquartynoic acid; erythrodiol, betulinic acid, palmitic acid, myristic acid	Cursino <i>et al.</i> (2009), Cursino <i>et al.</i> (2012), Dembitsky (2006), El-Seedi <i>et al.</i> (1994)
<i>Monnina obtusifolia</i> H.B.K. Aerial parts	1-O-(4-hydroxy-2-methylene-butanolic acid)-6-O- β -D-(4-hydroxy-2-methylene-butanoyl)-glucopyranose; 1-O-(isopentenyl)-6-O- β -D-(4-hydroxy-2-methylene-butanoyl)-glucopyranose; 1-O-(4-hydroxy-2-methylene-butanolic acid)-6-O- β -D-(isovaleroyl)-glucopyranose; 1-O-(3-methylbut-3-enyl)-6-O- β -D-(isovaleroyl)- glucopyranose; sucrose esters: 3,4-O- β -D-di-feruloyl-fructofuranosyl-6-O- α -D- (p-coumaroyl)-glucopyranoside; 3,4-O- β -D-di-feruloyl-fructofuranosyl-6-O- α -D-(caffeoyl)-glucopyranoside; 1,3,5-trihydroxy-2-methoxyxanthone; 1,3,6-trihydroxy-2,5-dimethoxyxanthone; 1,5-dihydroxy-3-methoxyxanthone; 1,3,6-trihydroxy 2, S dimethoxyxanthone	Lepore <i>et al.</i> (2011), Pinto <i>et al.</i> (1994)
<i>Senna multiglandulosa</i> (Jacq.) H.S. Irwin & Barneby Leaves Seeds	Emodin; floribundone-1; torosanin-9', 10'-quinone; anhydrophlegmacin; 1,4 quinone moiety, 9-(phycion-7'-yl)-5,10-dihydroxy-2-methoxy-7-methyl-1,4- anthraquinone; anhydrophlegmacin-9, 10-quinone B ₂ ; quercetin 7, 3' - dimethyl ether-3-O-galactoside; kaempferol -3-O-galactorhamnoside; α -amyryn, β -sitosterol Torosachryson; phycion; floribundone-1; anhydrophlegmacin; isosengulone; phycio-9-antrone. phlegmacin A ₂ and B ₂	Abegaz <i>et al.</i> (1994), Alemayehu and Abegaz (1996), Dave and Ledwani (2012), Ganapaty <i>et al.</i> (2002)
<i>Uncaria tomentosa</i> (Will.) DC. Bark Leaves	Mitraphylline; isomitraphylline; pteropodine (uncarine C); speciophylline (uncarine D); isopteropodine (uncarine E); uncarine F; speciophyllin; isomitraphylline; isopteropodin; 7-deoxyloganic acid; quinovic acid glycosides Rhynchophylline; isorhynchophylline; mitraphylline; isomitraphylline; dihydrocornyntheune; hirsutine; hirsuteine	Bacher <i>et al.</i> (2006), Dietrich <i>et al.</i> (2014), Muhammad <i>et al.</i> (2001), Oktayoglou and Mericli (2003), Sheng <i>et al.</i> (2000)

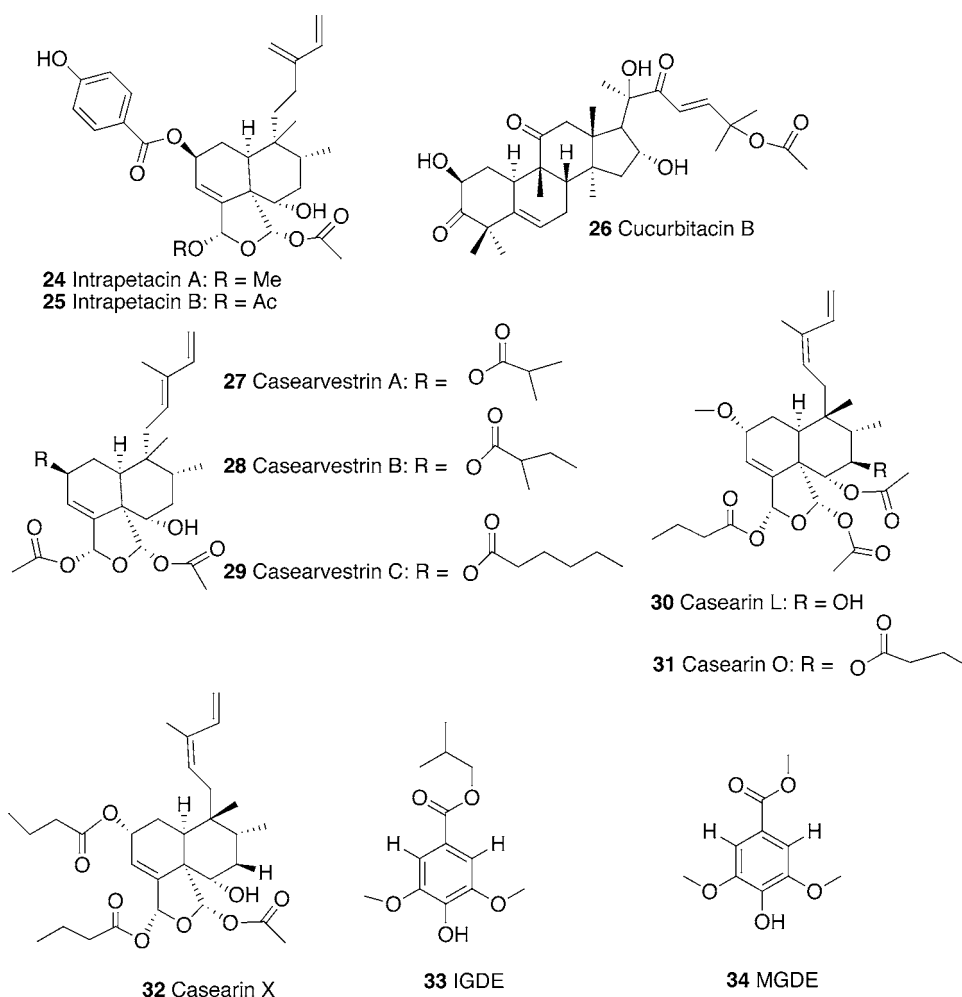
Fig. 2 Structures 15 to 23

ERa, EGFR/MAPK, and EGFR/PI3 K/AKT pathways (Zhan *et al.*, 2012).

Marsdenia condurango Rchb. f

Also known as *Gonolobus condurango*, this plant belongs to the Apocynaceae family. It is a native liana from Ecuador and is distributed along the Andes and the Amazon rainforest, in particular in Azuay, El Oro, Guayas, Loja, and Zamora-Chinchi provinces at altitudes from 1,000 to 2,000 m.a.s.l. (de la Torre *et al.*, 2008). It is used in traditional medicine to treat cancer, syphilis and other inflammatory processes (Tene *et al.*, 2007). Some pregnane glycosides have been isolated from the condurango's bark (Berger *et al.*, 1988; Hayashi *et al.*, 1980, 1981). Chemotherapeutic potential of condurango glycoside-rich extract (condurangoglycoside A, A0 E2) was evaluated in non small cell lung cancer, NSCLC cells, with a IC_{50} of 0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Condurango glycoside-rich extract-induced apoptosis via DNA damage was evidenced, cell cycle arrest

at subG0/G1 (Sikdar *et al.*, 2014). The major component described in the bark's extracts is the condurango glycoside A (7), which is capable of inducing DNA damage resulting in reduction of the cell viability of HeLa cervical cancer cells, reactive oxygen species (ROS) induction and subsequent p53 activation, and induction of cell death through apoptosis (Bishayee *et al.*, 2013). A large amount of coumarins and flavonoids have been isolated from the bark of *M. condurango* (Table 2), many possess antitumor activity (Gurib-Fakim, 2006; Agostini *et al.*, 2005), as the case of quercetin flavonol (Ji *et al.*, 2009). Quercetin (8) is an efficient anticancer agent that induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells, HT29 colon carcinoma (Xavier *et al.*, 2009) and A431 epidermal carcinoma cells with the modulation of tyrosine kinase epidermal growth factor receptor (EGFR). Using the in silico molecular docking analysis with Maestro 9.3 molecular docking software indicated that quercetin possesses affinity against wild-type EGFR, as well as two mutated EGFR (Singh and Bast, 2014). Although there are several isolated secondary metabolites that present antitumor activity individually,

Fig. 3 Structures 24 to 34

there are many reports of their effectiveness in tinctures and other phyto-derived drugs (Banerji *et al.*, 2008).

Senna multiglandulosa (Jacq.) H.S. Irwin and Barneby

This plant is a native shrub from Ecuador, distributed along the Andes, and can be found in Azuay, Carchi, Chimborazo, Imbabura, Napo, Pichincha, and Tungurahua provinces at altitudes from 2,000 to 3,500 m.a.s.l (de la Torre *et al.*, 2008). Emodin (**9**) and other bianthraquinones (Table 2) (Abegaz *et al.*, 1994) have been isolated from this species. Emodin is a well-known cytotoxic molecule, capable of inducing apoptosis and halting growth in many human cell lines, including human proximal tubular epithelial cells (HK-2 (Wang *et al.*, 2007)), cervical cancer cells (HeLa, Ca Ski, ME-180 and Bu 25TK) (Yaoxian *et al.*, 2013; Srinivas *et al.*, 2003), prostate (LNCaP) cancer cells (Yu *et al.*, 2008), and breast cancer cells overexpressing HER-2/neu (MDA-MB453) (Zhang *et al.*, 1998) (Ko *et al.*, 2010). The use of this molecule to increase the susceptibility of tumor cells to cytotoxic therapeutic agents has also

been suggested as an innovative strategy, as emodin is an ROS generator (Dave and Ledwani, 2012; Qu *et al.*, 2013). Another molecule with cytotoxic activity isolated from this species is physcion (**10**), an anthraquinone derivative, which is widely distributed in nature. While physcion has been shown no cytotoxicity against human breast cancer (MCF-7) and human colon adenocarcinoma (SW620) cells (Almeida *et al.*, 2010), it exerted an inhibitory activity against HeLa cell proliferation by causing apoptosis ($IC_{50} \sim 100$) with formation of intracellular ROS. Furthermore, physcion induced the apoptotic cell death in HeLa cells by activating the expression of caspase family enzymes and p53 followed by Bax and Bcl-2 deregulation (Wijesekara *et al.*, 2014).

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken

This plant is an herb or subshrub introduced and grown in Ecuador and has been found in Azuay, Cotopaxi, Galápagos, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Manabí, Napo, and Pichincha provinces at altitudes from 2,000 to 3,000 m.a.s.l.

Table 3 Composition chemical of species indigenous to Ecuador with anticancer potential

Scientific name Parte used	Metabolites secondary isolated	Reference
<i>Annona squamosa</i> L. Bark Twigs Seeds	Squamone; bullatacin 5-((6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-yl)methyl)-2-methoxybenzene-1,3-diol; (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1,3-diol; 6,7-dimethoxy-2-methylisoquinolinium; rutin Annonacin A; squamosten A; neoannonin; squamocin: B, D, E, F, I, K, and N, annonin-III (or motrilin), squamostatin: A, D, and E; annosquacins: A, B, C, and D; annosquatin: A and B; squamocin	Rupprecht <i>et al.</i> (1990), Kumar and Kumar (2013), Zafra-Polo <i>et al.</i> (1996) Chen <i>et al.</i> (2012), Rupprecht <i>et al.</i> (1990)
<i>Annona montana</i> Macfad Bark Leaves Seeds	Phenanthrene-1,4,quinone; annoquinone A; physcion; β -sitostenone Montanacins: B and E Montacin; cis-montacin; annonacin; cis-annonacin; annomontacin, cis-annomontacin; montalicins: G and H; monlicins: A and B; (+)-monhexocin and (–)- monhexocin; murisolin; 4-deoxyannomontacin; muricatacin.; aromin; cis-annonacin-10-one; gigantetrocin; tucupentol	Wang <i>et al.</i> (1999), Liaw <i>et al.</i> (2004, 2005), Alvares <i>et al.</i> (2009)
<i>Annona muricata</i> L. Roots Bark Leaves Fruit Seeds	Montecristin; cohibin: A, and B; cis-solamin; cis-panatellin; cis-uvarimicin IV; cis-reticulatacin-10-one; cis-reticulatacin Epoxymurin A (or epomuricenin A); epoxymurin B; muricatin: A, B and C Annoreticuin-9-one; cis-annoreticuin; sabadelin; annopentocin: A, B, and C; (2,4-trans)-annomuricin-D-one; muricoreacin; murihexocin; muricapentocin; annomuricin E Muricins J, K, and L Epomuricenin A (or epoxymurin A); epomuricenin B; diepomuricanin A; corepoxylone; solamin; murisolin; corossolin; corossolone; gigantetrocin B; muricatetrocin: A and B	Alali <i>et al.</i> (1999) Ragasa <i>et al.</i> (2012), Sun <i>et al.</i> (2014), Zafra-Polo <i>et al.</i> (1996)
<i>Casearia sylvestris</i> Sw. Leaves	Casearins: A – T; (2 β -methoxy-cleroda-3, 13-dien-18-carboxy-15, 16-olide, 15E-methoxy-cleroda-3, 12-dien-18-carboxy-15, 16-olide; 15-hydroxy- 3-cleroden-2-one; (+)-hardwickiic acid; 15-oxo-echinophyllin A; casearvestrins: A - C; echinophyllin A, (–)-patagonic acid; tyrosol; oplopanone; 4-hydroxy-4-methyl-2-[(1 <i>R</i>)-1-(1 methylethyl)-4-oxopentyl]-2-cyclohexen-1-one; 1 β ,6 α -dihydroxy- eudesman-4(15)-ene	Oberlies and Burgess (2002), Gonzaga dos Santos <i>et al.</i> (2010), Wang <i>et al.</i> (2009)
<i>Cinchona officinalis</i> L. Bark	Quinine; quinidine; cinchonine; cinchonidine; tannin; quinate; quinic; cinchotannic	Kacprzak (2013)
<i>Licania intrapetiolaris</i> Spruce ex Hook f Roots	Intrapetacin: A and B; cucurbitacin B	Oberlies <i>et al.</i> (2001)

(de la Torre *et al.*, 2008). It is used in the traditional medicine of many countries, including India, Mexico, and Nicaragua (Afzal *et al.*, 2012). In addition to being a commonly grown plant, it is also of great importance in the everyday life of the Kichwa people (Innerhofer and Bernhardt, 2011). *B. pinnatum* is used to cure many infections, intestinal diseases, wounds, and other ailments. Bufadienolides such as bryophyllin A (11) and bryophyllin B (12) have been isolated from this plant, in addition to bersaldegennin-3-acetate. Bryophyllin A and B show cytotoxic activity in many tumor cell lines. It is important to highlight that bryophyllin B has shown potent in vitro cytotoxicity in KB cervical cancer cells

with an IC₅₀ of 80 ng/mL (Yamagishi *et al.*, 1989; Supratman *et al.*, 2001). Additionally, the chloroform extract of the leaves inhibits the growth of HeLa cells, in addition to anti-HPV activity (Mahata *et al.*, 2012).

Minquartia guianensis Aubl

This plant is a native tree of Ecuador. It is distributed along the coast, in the Andes Mountains, and in the Amazon rainforest. Its populations can be found in Esmeraldas, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Sucumbíos, and Tungurahua provinces at altitudes from 0 to 2,000 m.a.s.l. (de la

Torre *et al.*, 2008). According to ethnomedical information, it is used to treat lung cancer. From the bark of the root of this plant, erythrodiol, betulinic acid, palmitic acid, myristic acid, and stearic acid have been isolated, but the major component is minquartynoic acid (**13**) (El-Seedi *et al.*, 1994), which has proven to have cytotoxic activity in the following: Col2, human colon cancer; KB, human oral epidermoid carcinoma; KB-V+, multidrug-resistant KB assessed in the presence of vinblastine (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); KB-V–, multidrug-resistant KB assessed in the absence of vinblastine; LNCaP, hormone-dependent human prostate cancer; and SW626, human ovarian cancer; SKNSH, human neuroblastoma cancer, with an IC_{50} of between 1.6 and 5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Ito *et al.*, 2001). Certain derivatives have been developed from this acid to increase not only its activity as an antitumor agent but also its antiviral and antiparasitic properties (Dembitsky, 2006; Gung and Dickson, 2002; Gachet *et al.*, 2010).

From the leaves of this plant, triterpenes such as taraxerol (**14**), lupeol, lupin-3-one, and squalene have been isolated (Cursino *et al.*, 2009). Taraxerol is known for its anti-inflammatory properties, which could contribute to the reported ethnobotanical effect.

Monnina obtusifolia H.B.K

A native bush of Ecuador, this plant is distributed in the Andes Mountains. Its populations can be found in Bolívar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pastaza, Pichincha, and Tungurahua provinces at altitudes from 1,500 to 4,000 m.a.s.l. (de la Torre *et al.*, 2008). Since angiogenesis, the growth of new blood vessels, is important in the metastasis and growth of tumors (Bailón-Moscoso *et al.*, 2014), the n-BuOH extract obtained from the leaves of *Monnina obtusifolia* was shown to inhibit VEGF-A or the interaction of placental growth factor with Flt-1 (VEGF receptor 1) (Lepore *et al.*, 2011).

Species indigenous to Ecuador with anticancer potential

This group of plants encompasses those plants that have initially been reported for various uses according to Ecuadorian traditional medicine. In addition, recent studies show that their components (Figs. 2, 3) are effective in treating certain types of cancer and the composition chemical of species are described in Table 3

Cinchona officinalis L

A bush or tree belonging to the Rubiaceae family, this plant is native to Ecuador and distributed in the Andes Mountains. Its populations can be found in Azuay, Bolívar,

Cañar, Chimborazo, El Oro, Loja, Morona-Santiago, and Zamora-Chinchipec provinces at altitudes from 1,000 to 3,500 m.a.s.l. (de la Torre *et al.*, 2008). The bark of the *Cinchona spp.* was used in ancient times by the Paltas in Ecuador as an antipyretic agent; it was introduced to Europe in the year 1,640 (Ferreira Júnior *et al.*, 2012). This bark was the main therapy against malaria in Europe until 1,820, when pure quinine (**15**) was isolated. Alongside its derivative chloroquine (**16**), it has been widely used against paludism; Bark of *C. officinalis* may contain 5–14 % of alkaloids (Kacprzak, 2013). Many alkaloids isolated from *C. officinalis* and analogs have been effective cytotoxic agents in HL-60 leukemia, HepG2 hepatoma, MCF-7 breast adenocarcinoma and SH-SY5Y neuroblastoma cells with IC_{50} of between 0,75 and 89 μM (Károlyi *et al.*, 2012). Chloroquine has proven to be effective against many cell lines, especially in low-pH cancer types, in addition to inducing apoptosis and autophagocytosis (Solomon and Lee, 2009). Quinidine (**17**), another major alkaloid presents in *C. officinalis*, promotes the interruption of the cell cycle in G1/G0, causing the accumulation of lipid droplets in the membrane and the expansion of the cytoplasm, allowing cellular differentiation in MCF7 human breast cancer cells (Solomon and Lee, 2009). In addition, the alkaloid synthesis of *Cinchona* conjugates with fluorophores with cytotoxic properties in the KB cell line has been reported; these conjugates can also be used as markers (Baraniak *et al.*, 2011). In the early 1990s, it was demonstrated that quinine alkaloids were capable of reverting the effects of cellular resistance to anthracyclines and doxorubicin (Solary *et al.*, 1991; Genne *et al.*, 1992), and thus, they are currently used as ATP shuttle inhibitors (Gottesman *et al.*, 2002). Chloroquine and 3-hydroxyquinoline (**18**) are both being tested in the clinical trials (Phase I and II) for use in combination treatments with various drugs, as there is a synergy and some selectivity of the induction of apoptosis in cancer cells of the lung, breast, and glioblastoma (Solomon and Lee, 2009).

Annona squamosa L., *A. montana* Macfad y *A. muricata* L

These three species have been used in traditional medicine for rheumatism. They belong to the Annonaceae family, which is widely distributed in the tropical and subtropical regions. *A. squamosa* is a tree cultivated in Ecuador and is distributed along the coast. Its populations can be found in the Guayas province at altitudes from 0 to 500 m.a.s.l. *A. muricata* is a native small tree or tree grown in Ecuador; it is also distributed along the coast, on the Galapagos Islands, and in the Amazon rainforest (de la Torre *et al.*, 2008). Collections can be found in Esmeraldas, Galápagos, Guayas, Imbabura, Los Ríos, Manabí, Morona-Santiago,

and Napo provinces at altitudes from 0 to 500 m.a.s.l. (de la Torre *et al.*, 2008). *A. montana* is a native tree of Ecuador that is distributed along the coast and in the Amazon rainforest. Its populations can be found in Esmeraldas, Guayas, and Napo provinces at altitudes from 0 to 500 m.a.s.l. The most representative secondary metabolites of this family species are the acetogenins (ACGs) (Liaw *et al.*, 2010). The ACGs are characterized by a wide range of biological activities, such as immunosuppressive, pesticide, antisedative, antimalarial, and antitumor cytotoxicity (Liaw *et al.*, 2010; Rupprecht *et al.*, 1990). The action mechanism by which ACGs are cytotoxic is related to the inhibition of complex I in the electron transport system in the mitochondrion (Zafra-Polo *et al.*, 1996). ACGs also inhibit NADH oxidase, which is found in the plasma membrane of the tumor cells. The immediate effect is a decrease in ATP levels (Alali *et al.*, 1999; Fantin and Leder, 2006). The high demand for ATP by tumor cells could explain the sensitivity of carcinoma cells to complex I inhibitors (Glover *et al.*, 2007), suggesting that the ACGs could be excellent candidates for the development of new antitumor agents, even more effective against multiple drug-resistant (MDRs) tumors due to the flux of the ATP pump (Alali *et al.*, 1999). Most studies of the antitumor activity of ACGs are performed in tumor cell; the impressive characteristic about these compounds is that their IC_{50} is between 10^{-6} and 10^{-14} M. Squamocin (**19**) was also found to inhibit the proliferation of K562 cells via G2/M arrest in association with the induction of p21 and p27, and the reduction of Cdk1 and Cdc25C kinase activities (Liaw *et al.*, 2010). Bullatacin (**20**) has been demonstrated to induce apoptosis in various types of cell lines (HL-60, Hep G2, KB and CCM2) (Chang *et al.* 1993; Chiu *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2006; Derbré *et al.*, 2006). Bullatacin was found to be effectively cytotoxic to the human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells, while it was more cytostatic to the parental non-resistant wild-type (MCF-7/wt) cells (Oberlies *et al.*, 1997). Cisannonacin (**21**) was selectively cytotoxic to colon adenocarcinoma cells, with a potency 10,000 times that of Adriamycin (Lim, 2012), while cis-annonacin-10 (**22**)-one was powerful inhibitor of NADH oxidase mitochondrial complex I (IC_{50} :0.8nM). Murisolin (**23**) was reported to show cytotoxic activity against human tumor cell lines with potency from 105 to 106 times that of adriamycin (Lim, 2012).

Licania intrapetiolaris Spruce ex Hook. f

A tree from the Ecuadorian amazon rainforest, this plant belongs to the Chrysobalanaceae family. Its populations can be found in Sucumbíos province. The clerodane-type diterpenoids intrapetacin A (**24**) and intrapetacin B (**25**)

were isolated for the first time from this species and were found to be cytotoxic in KB cells (human oral epidermoid carcinoma), with IC_{50} of 2 and 0.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Oberlies and Burgess, 2002). In addition, a highly potent triterpene, cucurbitacin B (**26**) was found (Oberlies and Burgess, 2002; Mukherjee *et al.*, 2013), with proven cytotoxic activity in human hepatocellular carcinoma cells (BEL-7402)(Chan *et al.*, 2010b), osteosarcomas (MG-63 and SAOS-2), (Lee *et al.*, 2011), and Hep-2 laryngeal cells (Liu *et al.*, 2010). Cucurbitacin B is capable of inhibiting various leukemia cell lines (CCRF-CEM, K562, MOLT-4, RPMI-8226, and SR). The growth of leukemia cells was inhibited by cucurbitacin B with IC_{50} ranged from 15.6 nM to 35.3 nM and arrest of cell cycle (Chan *et al.*, 2010b) and plays a role of an inhibitor of many signaling pathways in cancer cells (Chan *et al.*, 2010a).

Casearia sylvestris Sw

This plant is a shrub or tree belonging to the Flacourtiaceae family, which is native to Ecuador. It is distributed along the coast, in the Andes Mountains and in the Amazon rainforest. Collections can be found in Carchi, El Oro, Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, and Zamora-Chinchipe provinces at altitudes from sea level to 2,000 m.a.s.l. (de la Torre *et al.*, 2008). It is used in traditional medicine in Colombia to treat tumors (Graham *et al.*, 2000). Aqueous-ethanolic and chloroform extracts of the leaves of *C. sylvestris* Sw exhibit activity cytotoxic in MCF-7 cells, the IC_{50} value was determined at 141 $\mu\text{g/mL}$ for aqueous-ethanolic and 66 $\mu\text{g/mL}$ for chloroform. Also in vivo, reduced proliferation was observed in tumor cells from animals treated with the extract from *Casearia sylvestris* (Felipe *et al.*, 2014). From samples collected in Ecuador, casearins A (**27**), B (**28**), and C (**29**) were isolated for the first time, with antitumor activity observed in the following cell lines: lung cancer (LX-1), colon cancer (HCT116), and ovarian cancer (A2780), with IC_{50} doses between 0.12 and 0.89 μM . (Oberlies and Burgess, 2002). Casearins with antitumor activity have also been isolated from this species (Gonzaga dos Santos *et al.*, 2010; Felipe *et al.*, 2014). Casearins L (**30**), O (**31**), and X (**32**) have a strong cytotoxic effect on leukemia cell lines (CEM, HL-60 and K-562) (Ferreira *et al.*, 2010). Casearin X was the most active compound studied, showing the dramatic cytotoxic effects on CEM and HL-60 cell lines (IC_{50} of 0.4 μM) and causing cell death via apoptotic pathways (Pinheiro *et al.*, 2014). Two compounds derived from gallic acid have been isolated from *C. sylvestris* leaves, isobutyl gallate-3,5-dimethyl ether (IGDE) (**33**) and methyl gallate-3,5-dimethyl ether (MGDE) (**34**) and have shown the antitumor activity in xenograft models of Ehrlich tumor cells and Lewis lung cancer cells (Da *et al.*, 2009).

Conclusion

It is clear that Ecuador holds a wide variety of plant species, resulting in a wide chemical diversity. Similarly, the few studies so far have shown the great potential of using these plant species against cancer, many of which traditionally used by various ethnic groups, not only from Ecuador. However, most studies have been conducted in vitro and a few in vivo; therefore, the need to increase research on extracts and secondary metabolites in pre-clinical studies and to look for the understanding of the mechanisms involved.

Acknowledgments We thank the valuable comments of Ing. Hernan Lucero of Departamento de Ciencias Naturales of Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador, and Dr. Edward Ratovitski of Head and Neck Cancer Research Division, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA. This work was partially supported by the grant from the SENESCYT (Quito, Ecuador) and Universidad Técnica Particular de Loja (Loja, Ecuador).

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abegaz B, Bezabeh M, Alemayehu G, Duddeck H (1994) Anthraquinones from *Senna multiglandulosa*. *Phytochemistry* 35:465–468
- Afzal M, Kazmi I, Khan R, Singh R, Chauhan M, Bisht T, Anwar F (2012) *Bryophyllum pinnatum*: a review. *Int J Res Biol Sci* 2:143–149
- Agostini FD, Izzotti A, Balansky RM, Bennicelli C, De Flora S (2005) Modulation of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* 591:173–186. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.034
- Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod* 62:504–540. doi:10.1021/np980406d
- Alemayehu G, Abegaz BM (1996) Bianthraquinones from the seeds of *Senna multiglandulosa*. *Phytochemistry* 41:919–921. doi:10.1016/0031-9422(95)00645-1
- Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, Lafrenie RM (2010) *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- α inhibitor through NF- κ B. *J Ethnopharmacol* 127:685–693. doi:10.1016/j.jep.2009.12.004
- Almeida A, Dethoup T, Singburadom N, Lima R, Vasconcelos MH, Pinto M, Kijjoa A (2010) The in vitro anticancer activity of the crude extract of the sponge-associated fungus *Eurotium cristatum* and its secondary metabolites. *J Nat Pharm* 1:25. doi:10.4103/2229-5119.73583
- Alvares O, Neske A, Chahboune N, Zafra-polo MC, Bardo A (2009) Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Chem Biodivers* 6:335–340
- Bacher N, Tiefenthaler M, Sturm S, Stuppner H, Ausserlechner MJ (2006) Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol* 132:615–622. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05907.x
- Bailón-Moscoso N, Romero-Benavides JC, Ostrosky-Wegman P (2014) Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumour Biol* 35:3981–3995. doi:10.1007/s13277-014-1649-y
- Balunas MJ, Jones WP, Chin YW, Mi Q, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Swanson SM, Pezzuto JM, Chai HB, Kinghorn AD (2006) Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. *Chem Biodivers* 3:897–915. doi:10.1002/cbdv.200690092
- Banerji P, Campbell DR, Banerji P (2008) Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homeopathic medicine: a Best Case Series Program of the National Cancer Institute USA. *Oncol Rep* 20:69–74
- Baraniak D, Kacprzak K, Celewicz L (2011) Synthesis of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)–Cinchona alkaloid conjugates via click chemistry: toward novel fluorescent markers and cytostatic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 21:723–726. doi:10.1016/j.bmcl.2010.11.127
- Berger S, Junior P, Kopanski L (1988) Structural revision of pregnane ester glycosides cortex and new compounds from *Condurango cortex* and new compounds. *Phytochemistry* 27:1451–1458
- Bishayee K, Paul A, Ghosh S, Sikdar S, Mukherjee A, Biswas R, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR (2013) *Condurango-glycoside-A* fraction of *Gonolobus condurango* induces DNA damage associated senescence and apoptosis via ROS-dependent p53 signalling pathway in HeLa cells. *Mol Cell Biochem*. doi:10.1007/s11010-013-1732-5
- Bourdy G, DeWalt SJ, Chávez de Michel LR, Roca A, Deharo E, Muñoz V, Balderrama L, Quenevo C, Gimenez A (2000) Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *J Ethnopharmacol* 70:87–109
- Cai Y, Chen Z, Phillipson J (1993) Diterpenes from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 32:755–760
- Cerón CE (2006) Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica los Andes Cent*, pp 285–293
- Chan KT, Li K, Liu SL, Chu KH, Toh M, Xie WD (2010a) Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Lett* 289:46–52. doi:10.1016/j.canlet.2009.07.015
- Chan KT, Meng FY, Li Q, Ho CY, Lam TS, To Y, Lee WH, Li M, Chu KH, Toh M (2010b) Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer Lett* 294:118–124. doi:10.1016/j.canlet.2010.01.029
- Chen Y, Chen JW, Wang Y, Xu SS, Li X (2012) Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. *Food Chem* 135:960–966. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.041
- Cheng AC, Jian CB, Huang YT, Lai CS, Hsu PC, Pan MH (2007) Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food Chem Toxicol* 45:2206–2218. doi:10.1016/j.fct.2007.05.016
- Chiu H, Chih T, Hsian Y, Tseng C (2003) Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2. 15. *Biochem Pharmacol* 65:319–327
- Cragg GM, Newman DJ (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 1830:3670–3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ (2009) Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 109:3012–3043. doi:10.1021/cr900019j
- Cursino LM, Spirotto A, Mesquita S, De Oliveira DW, Fernandes CC, Libório O, Junior P, Leão I, Nunez CV (2009) Triterpenes das folhas de *Minuartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). *Acta Amaz* 39:181–186

- Cursino LMDC, Nunez CV, Paula RCD, Nascimento MFAD, Santos PAD (2012) Triterpenes from *Minquartia guianensis* (Olacaceae) and in vitro antimalarial activity. *Quim Nova* 35:2165–2168. doi:10.1590/S0100-40422012001100011
- Da SL, Chaar S, Yano T (2009) Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). *Eur J Pharmacol* 608:76–83. doi:10.1016/j.ejphar.2009.02.004
- Dave H, Ledwani L (2012) A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. *Indian J Nat Prod Resour* 3:291–319
- De la Torre L, Navarrete H, Muriel M-P, Macía M, Balslev H (2008) Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, Quito, Aarhus
- De Marino S, Gala F, Zollo F, Vitalini S, Fico G, Visioli F, Iorizzi M (2008) Identification of minor secondary metabolites from the latex of *croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules* 13:1219–1229. doi:10.3390/molecules13061219
- De Martino L, Martinot JLS, Franceschelli S, Leone A, Pizza C, De Feo V (2006) Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *J Ethnopharmacol* 107:91–94. doi:10.1016/j.jep.2006.02.013
- Dembitsky VM (2006) Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. *Lipids* 41:883–924
- Derbré S, Duval R, Roué G, Garofano A, Poupon E, Brandt U, Susin S, Hocquemiller RA (2006) Semisynthesis and screening of a small library of pro-apoptotic squamocin analogues: selection and study of a benzoquinone hybrid with an improved biological profile. *ChemMedChem* 1:118–129. doi:10.1002/cmde.200500011
- Diétrich F, Kaiser S, Rockenbach L, Figueiró F, Bergamin LS, da Cunha FM, Morrone FB, Ortega GG, Battastini AMO (2014) Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. *Food Chem Toxicol* 67:222–229. doi:10.1016/j.fct.2014.02.037
- El-Seedi H, Hazell A, Torssell K (1994) Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *minquartia guianensis*. *Phytochemistry* 35:1297–1299
- Fantin VR, Leder P (2006) Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* 25:4787–4797. doi:10.1038/sj.onc.1209599
- Felipe KB, Kwiecinski MR, da Silva FO, Bucker NF, Farias MS, Castro LSEPW, de Souza Grinevicius VMA, Motta NS, Correia JFG, Rossi MH, Pedrosa RC (2014) Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *J Ethnopharmacol* 155:1492–1499. doi:10.1016/j.jep.2014.07.040
- Ferreira Júnior WS, Cruz MP, Dos Santos LL, Medeiros MFT (2012) Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): plants for medicinal use from the 16th century to the present. *J Herb Med* 2:103–112. doi:10.1016/j.hermed.2012.07.003
- Ferreira PP, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C (2010) *Casearin X* exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. *Chem Biol Interact* 188:497–504. doi:10.1016/j.cbi.2010.08.008
- Forester SC, Lambert JD (2014) Polyphenols in human health and disease. *Polyphenols Hum Heal Dis*, pp 1309–1322. doi:10.1016/B978-0-12-398456-2.00098-0
- Fujiki H, Suganuma M, Imai K, Nakachi K (2002) Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Lett* 188:9–13. doi:10.1016/S0304-3835(02)00379-8
- Gachet MS, Lecaro JS, Kaiser M, Brun R, Navarrete H, Muñoz RA, Bauer R, Schühly W (2010) Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 128:184–197. doi:10.1016/j.jep.2010.01.007
- Ganapaty S, Thomas PS, Ramana KV, Vidyadhar K, Chakradhar V (2002) A review of phytochemical studies of *Cassia* species. *J Nat remedies* 2:102–120
- García Prado E, García Gimenez MD, De la Puerta Vázquez R, Espartero Sánchez JL, Sáenz Rodríguez MT (2007) Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine* 14:280–4. doi:10.1016/j.phymed.2006.12.023
- Genne P, Dimanche-Boitrel MT, Mauvernay RY, Gutierrez G, Duchamp O, Petit JM, Martin F, Chauffert B (1992) Cinchonine, a potent efflux inhibitor to circumvent anthracycline resistance in vivo. *Cancer Res* 52:2797–2801
- Glover CJ, Rabow AA, Isgor YG, Shoemaker RH, Covell DG (2007) Data mining of NCI's anticancer screening database reveals mitochondrial complex I inhibitors cytotoxic to leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* 73:331–340. doi:10.1016/j.bcp.2006.10.005
- Gonzaga dos Santos A, Pinheiro Ferreira P, Vieira G, Perez C, Gomes Tininis A, Silva G, da Silva V, Costa-Lotufo LV, do Ó Pessoa C, Cavalheiro A (2010) *Casearin X*, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem Biodivers* 7:205–215
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48–58. doi:10.1038/nrc706
- Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR (2000) Plants used against cancer: an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J Ethnopharmacol* 73:347–377
- Gung BW, Dickson H (2002) Total synthesis of (-)-minquartynoic acid: an anti-cancer, anti-HIV natural product. *Org Lett* 4:2517–2519
- Gupta M (2001) Natural products research in Latin America. *Pharm Biol* 39:80–91. doi:10.1076/phbi.39.7.80.5866
- Gupta D, Bleakley B, Gupta RK (2008) Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol* 115:361–380. doi:10.1016/j.jep.2007.10.018
- Gurib-Fakim A (2006) Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27:1–93. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008
- Gurrola-Díaz CM, García-López PM, Gulewicz K, Pilarski R, Dihlmann S (2011) Inhibitory mechanisms of two *Uncaria tomentosa* extracts affecting the Wnt-signaling pathway. *Phytomedicine* 18:683–690. doi:10.1016/j.phymed.2010.11.002
- Hayashi K, Wada K, Mitsuhashi H, Bando H, Takase M, Terada S, Koide Y, Aiba T, Natira T, Mizuno D (1980) Antitumor active glycosides from *Condurango* Cortex. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 28:1954–1958
- Hayashi K, Wada K, Mitsuhashi H, Bando H, Takase M, Terada S, Koide Y, Aiba T, Narita T (1981) Further investigation of antitumor condurangoglycosides with C-18 oxygenated aglycone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 29:2725–2730
- Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB (2005) Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66:5–29. doi:10.1016/j.phytochem.2004.10.022
- Innerhofer S, Bernhardt K-G (2011) Ethnobotanic garden design in the Ecuadorian Amazon. *Biodivers Conserv* 20:429–439. doi:10.1007/s10531-010-9984-9

- Ito A, Cui B, Chávez D, Chai H (2001) Cytotoxic polyacetylenes from the twigs of *ochanostachys a mentacea*. *J Nat Prod* 64:246–248
- Ji H, Li X, Zhang H (2009) Natural products and drug discovery. *Eur Mol Biol Organ*, pp 194–200
- Jones K (2003) Review of *Sangre de Drago* (*Croton lechleri*)-a south american tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional. *J Altern Complement Med* 9:877–896
- Joppa LN, Visconti P, Jenkins CN, Pimm SL (2013) Achieving the convention on biological diversity's goals for plant conservation. *Science* 341:1100–1103. doi:10.1126/science.1241706
- Kacprzak KM (2013) Chemistry and biology of cinchona alkaloids. In: Ramawat KG, Mérillon J-M (eds) Springer. Berlin Heidelberg, Berlin, pp 606–634
- Kanehisa Labs (2015) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In: Kanehisa Lab. http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?dr:D04383. Accessed 13 Feb 2015
- Károlyi BI, Bösze S, Orbán E, Sohár P, Drahos L, Gál E, Csámpai A (2012) Acylated mono-, bis- and tris- cinchona-based amines containing ferrocene or organic residues: synthesis, structure and in vitro antitumor activity on selected human cancer cell lines. *Molecules* 17:2316–2329. doi:10.3390/molecules17032316
- Ko JC, Su YJ, Lin ST, Jhan JY, Ciou SC, Cheng CM, Lin YW (2010) Suppression of ERCC1 and Rad51 expression through ERK1/2 inactivation is essential in emodin-mediated cytotoxicity in human non-small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 79:655–664. doi:10.1016/j.bcp.2009.09.024
- Kumar Y, Kumar SS (2013) Two new tetrahydroisoquinoline analogs from Indian medicinal plant *Annona squamosa*. *J Pharm Res* 7:510–515. doi:10.1016/j.jopr.2013.06.022
- Lee DH, Thoennissen NH, Goff C, Iwanski GB, Forscher C, Doan NB, Said JW, Koefler HP (2011) Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer Lett* 306:161–170. doi:10.1016/j.canlet.2011.03.001
- Lepore L, Malafrente N, Condero FB, Gualtieri MJ, Abdo S, Dal Piaz F, De Tommasi N (2011) Isolation and structural characterization of glycosides from an anti-angiogenic extract of *Monnina obtusifolia* H.B.K. *Fitoterapia* 82:178–183. doi:10.1016/j.fitote.2010.08.018
- Liaw CC, Chang FR, Wu YC, Wang H-K, Nakanishi Y, Bastow KF, Lee KH (2004) Montacin and cis-montacin, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *J Nat Prod* 67:1804–1808. doi:10.1021/np030216p
- Liaw CC, Chang FR, Chen SL, Wu CC, Lee KH, Wu YC (2005) Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Bioorg Med Chem* 13:4767–4776. doi:10.1016/j.bmc.2005.05.008
- Liaw CC, Wu TY, Chang FR, Wu YC (2010) Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Med* 76:1390–1404. doi:10.1055/s-0030-1250006
- Lim T (2012) Edible medicinal and non-medicinal plants volume 1. *Fruits*. 1:851. doi:10.1007/978-90-481-8661-7
- Liu T, Peng H, Zhang M, Deng Y, Wu Z (2010) Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Eur J Pharmacol* 641:15–22. doi:10.1016/j.ejphar.2010.04.062
- Mahata S, Maru S, Shukla S, Pandey A, Mughesh G, Das BC, Bharti AC (2012) Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. Leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 12:15. doi:10.1186/1472-6882-12-15
- Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Frolidi G (2012) *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *J Ethnopharmacol* 144:747–753. doi:10.1016/j.jep.2012.10.032
- Muhammad I, Dunbar DC, Khan R, Ganzera MA, Khan IA (2001) Investigation of *Uña De Gato* I. 7-Deoxyloganic acid and 15N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 57:781–785
- Mukherjee PK, Nema NK, Maity N, Sarkar BK (2013) Phytochemical and therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia* 84:227–236. doi:10.1016/j.fitote.2012.10.003
- Oberlies N, Burgess J (2002) Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J Nat Prod* 65:1–3
- Oberlies NH, Croy VL, Harrison ML, McLaughlin JL (1997) The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 115:73–79
- Oberlies NH, Burgess JP, Navarro H, Pinos RE, Soejarto DD, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Wani MC, Wall ME (2001) Bioactive constituents of the roots of *Licania intrapetiolaris*. *J Nat Prod* 64:497–501
- Oktayoglu E, Mericli A (2003) Chemistry and pharmacology of *Uncaria tomentosa* (Cats Claw). *J Fac Pharm Istanbul* 35–36:149–157
- Pilarski R, Filip B, Wietrzyk J, Kuraś M, Gulewicz K (2010) Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine* 17:1133–1139. doi:10.1016/j.phymed.2010.04.013
- Pilarski R, Gurrola-Díaz CM, García-López PM, Soldevila G, Olejnik A, Grajek W, Gulewicz K (2013) Enhanced proapoptotic response of the promyelocytic leukemia HL-60 cells treated with an *Uncaria tomentosa* alkaloid preparation. *J Herb Med*, pp 1–8. doi:10.1016/j.hermed.2013.04.002
- Pinheiro PM, Gadelha GC, Barbosa DJ, de Costa NDJ, da Machado KC, Gonzaga Dos Santos A, Cavalheiro AJ, da Bolzani VS, Siqueira DH, Pessoa C (2014) Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. *Chem Biol Interact* 222C:112–125. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.015
- Pinto DCG, Fuzzati N, Pazmino XC, Hostettmann K (1994) Xanthone and antifungal constituents from *Monnina obtusifolia*. *Phytochemistry* 37:875–878. doi:10.1016/S0031-9422(00)90375-3
- Pohle P, Reinhardt S (2004) Indigenous knowledge of plants and their utilization among the Shuar of the lower tropical mountain forest in southern Ecuador. *Lyonia* 7:133–149
- Qu K, Shen N, Xu X, Su H, Wei J, Tai M, Meng F, Zhou L, Zhang Y, Liu C (2013) Emodin induces human T cell apoptosis in vitro by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Acta Pharmacol Sin* 34:1217–1228. doi:10.1038/aps.2013.58
- Ragasa CY, Soriano G, Torres OB, Don MJ, Shen CC (2012) Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacogn J* 4:32–37. doi:10.5530/pj.2012.32.7
- Rinner B, Li ZX, Haas H, Siegl V, Sturm S, Stuppner H, Pfragner R (2009) Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells. *Anticancer Res* 29:4519–4528
- Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, Paganetto G (2003) Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomedicine* 10:139–144. doi:10.1078/094471103321659843
- Rupprecht JK, Hui YH, McLaughlin JL (1990) Annonaceous acetogenins: a review. *J Nat Prod* 53:237–278
- Salatino A, Salatino M, Negri G (2007) Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc* 18:11–33

- Sheng Y, Pero RW, Wagner H (2000) Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Phytomedicine* 7:137–143. doi:10.1016/S0944-7113(00)80086-0
- Sikdar S, Mukherjee A, Ghosh S, Khuda-Bukhsh AR (2014) Condurango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer, in vitro and in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol* 37:300–314. doi:10.1016/j.etap.2013.12.004
- Singh P, Bast F (2014) In silico molecular docking study of natural compounds on wild and mutated epidermal growth factor receptor. *Med Chem Res* 23:5074–5085. doi:10.1007/s00044-014-1090-1
- Solary E, Velay I, Chaffert B, Bidan J, Caillot D, Dumas M, Guy H (1991) Sufficient levels of quinine in the serum circumvent the multidrug resistance of the human leukemic cell line K562/ADM. *Cancer* 68:1714–1719
- Solomon VR, Lee H (2009) Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 625:220–233. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.063
- Srinivas G, Anto RJ, Srinivas P, Vidhyalakshmi S, Senan VP, Karunakaran D (2003) Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *Eur J Pharmacol* 473:117–125. doi:10.1016/S0014-2999(03)01976-9
- Sun S, Liu J, Kadouh H, Sun X, Zhou K (2014) Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). *Bioorg Med Chem Lett* 24:2773–2776. doi:10.1016/j.bmcl.2014.03.099
- Supratman U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H (2001) Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* × *tubiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:947–949
- Tene V, Malagon O, Finzi PV, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T (2007) An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *J Ethnopharmacol* 111:63–81
- Wang LQ, Zhao WM, Qin GW, Cheng KF, Yang RZ (1999) Four Novel Annonaceous Acetogenins from *annona* Montana. *Nat Prod Lett* 14:83–90. doi:10.1080/10575639908041214
- Wang C, Wu X, Chen M, Duan W, Sun L, Yan M, Zhang L (2007) Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells. *Toxicology* 231:120–128. doi:10.1016/j.tox.2006.11.064
- Wang W, Ali Z, Li X, Smillie TA, Guo D, Khan IA (2009) Fitoterapia New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. *Fitoterapia* 80:404–407. doi:10.1016/j.fitote.2009.05.013
- Weissleder R, Pittet MJ (2008) Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452:580–589. doi:10.1038/nature06917
- Wijesekara I, Zhang C, Van Ta Q, Vo TS, Li YX, Kim SK (2014) Physcion from marine-derived fungus *Microsporium* sp. induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. *Microbiol Res* 169:255–261. doi:10.1016/j.micres.2013.09.001
- Xavier CPR, Lima CF, Preto A, Seruca R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2009) Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 281:162–170. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.041
- Yamagishi T, Haruna M, Yan XZ (1989) Antitumor agents, 110, Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. *J Nat Prod* 5:1071–1079
- Yaoxian W, Hui Y, Yunyan Z, Yanqin L, Xin G, Xiaoke W (2013) Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer Cell Int* 13:71. doi:10.1186/1475-2867-13-71
- Yu CX, Zhang XQ, Kang LD, Zhang PJ, Chen WW, Liu WW, Liu QW, Zhang JY (2008) Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP. *Asian J Androl* 10:625–634. doi:10.1111/j.1745-7262.2008.00397.x
- Yuan SSF, Chang HL, Chen HW, Kuo FC, Liaw CC, Su JH, Wu YC (2006) Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sci* 78:869–874. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.068
- Zafra-Polo MC, González MC, Estornell E, Sahnaz S, Cortes D (1996) Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry* 42:253–271
- Zhan Y, Zhang Y, Liu C, Zhang J, Smith WW, Wang N, Chen Y, Zheng L, He L (2012) A novel taspine derivative, HMQ1611, inhibits breast cancer cell growth via estrogen receptor α and EGF receptor signaling pathways. *Cancer Prev Res (Phila)* 5:864–873. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0575
- Zhang L, Lau YK, Xi L, Hong RL, Kim DS, Chen CF, Hortobagyi GN, Chang C, Hung MC (1998) Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. *Oncogene* 16:2855–2863. doi:10.1038/sj.onc.1201813
- Zhang J, Zhang Y, Shan Y, Li N, Ma W, He L (2010) Synthesis and preliminary biological evaluation of novel taspine derivatives as anticancer agents. *Eur J Med Chem* 45:2798–2805. doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.001
- Zhu XF, Liu ZC, Xie BF, Li ZM, Feng GK, Xie HH, Wu SJ, Yang RZ, Wei XY, Zeng YX (2002) Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sci* 70:1259–1269

RESEARCH ARTICLE

Phytometabolite Dehydroleucodine Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Human Astrocytoma Cells through p73/p53 Regulation

Natalia Bailon-Moscoco^{1,2}, Gabriela González-Arévalo², Gabriela Velásquez-Rojas², Omar Malagon^{3,4}, Giovanni Vidari⁴, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,5}, Edward A. Ratovitski^{2,6}, Patricia Ostrosky-Wegman^{1*}

1 Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., Mexico, **2** Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador, **3** Departamento de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador, **4** Dipartimento di Chimica Organica, University of Pavia, Pavia, Italy, **5** Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México, D. F., Mexico, **6** Head and Neck Cancer Research Division, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, United States of America

* ostrosky@biomedicas.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Bailon-Moscoco N, González-Arévalo G, Velásquez-Rojas G, Malagon O, Vidari G, Zentella-Dehesa A, et al. (2015) Phytometabolite Dehydroleucodine Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Human Astrocytoma Cells through p73/p53 Regulation. PLoS ONE 10(8): e0136527. doi:10.1371/journal.pone.0136527

Editor: A R M Ruhul Amin, Winship Cancer Institute of Emory University, UNITED STATES

Received: April 15, 2015

Accepted: August 4, 2015

Published: August 26, 2015

Copyright: © 2015 Bailon-Moscoco et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Funded by Prometeo Project of the Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Invocación (SENESCYT) – Ecuador, Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Invocación (SENESCYT) –Ecuador, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Universidad Técnica Particular de Loja. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Accumulating evidence supports the idea that secondary metabolites obtained from medicinal plants (phytometabolites) may be important contributors in the development of new chemotherapeutic agents to reduce the occurrence or recurrence of cancer. Our study focused on Dehydroleucodine (DhL), a sesquiterpene found in the provinces of Loja and Zamora-Chinchipe. In this study, we showed that DhL displayed cytostatic and cytotoxic activities on the human cerebral astrocytoma D384 cell line. With lactone isolated from *Gynoxys verrucosa* Wedd, a medicinal plant from Ecuador, we found that DhL induced cell death in D384 cells by triggering cell cycle arrest and inducing apoptosis and DNA damage. We further found that the cell death resulted in the increased expression of CDKN1A and BAX proteins. A marked induction of the levels of total TP73 and phosphorylated TP53, TP73, and γ -H2AX proteins was observed in D384 cells exposed to DhL, but no increase in total TP53 levels was detected. Overall these studies demonstrated the marked effect of DhL on the diminished survival of human astrocytoma cells through the induced expression of TP73 and phosphorylation of TP73 and TP53, suggesting their key roles in the tumor cell response to DhL treatment.

Introduction

Although the development of novel anti-cancer therapeutics has increased over the previous decades, the battle against cancers is far from over. Serious problems associated with the great diversity of human tumors remain, including their clonal nature and origin from adult stem

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

cells, acquired resistance to known chemotherapeutics agents, inability to efficiently eliminate cancer cells without harming the adjacent normal cells, and many others. Thus, the quest for more efficient, specific and natural anti-cancer compounds is still ongoing. Plant-derived active phytometabolites, as well as their semi-synthetic and synthetic analogs, have served as a major route to the development of new pharmaceuticals compounds [1]. Currently, there are more than 200 naturally produced drugs in preclinical/clinical development or in the clinic [2]. The therapeutic properties of medicinal plants are generally attributed to secondary metabolites, such as sesquiterpene lactones, which constitute a large and diverse group of biologically active chemicals that have been identified in several plant families [3]. Sesquiterpene lactones are plant-derived compounds often used in traditional medicine against inflammation and cancer [3]. The greatest numbers of sesquiterpene lactones are found in the Asteraceae family with over 3000 reported structures [4]. One member of the Asteraceae family, the plant *Gynoxys verrucosa* Wedd, which is known as “guángalo” or “congona”, is a shrub grown in the provinces of Loja and Zamora-Chinchipe and has been used by the indigenous population of South America (e.g., Ecuador, Columbia, Peru) for medicinal purposes for ages [5]. Among the secondary metabolites isolated from this species is the sesquiterpene lactone Dehydroleucodine (DhL), which possesses anti-inflammatory, anti-parasitic and anti-microbial activities [6–9]. The main goal of this work was to determine whether DhL may display cytostatic, cytotoxic and genotoxic activities on human cancer cells.

Materials and Methods

Extraction of Dehydroleucodine from *Gynoxys verrucosa*

A corresponding research permission of the Ministerio del Ambiente of Ecuador was received to carry out the collection of the plant species *Gynoxys verrucosa* Wedd. It was verified that this species is not endangered and not protected according to “*Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*” [10]. The materials of *G. verrucosa* were collected in 2004 in Yangana, Loja, Ecuador, on a private property with the appropriate authorization of the homeowner. A voucher specimen was deposited into the Herbarium of the Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. The phytobiomass of *G. verrucosa* was extracted with methanol at room temperature, which was followed by evaporation of the solvent in a vacuum. Dehydroleucodine was isolated and characterized (S1 Fig), as previously described [6]. Dehydroleucodine stock solutions (1000 μ M) were prepared with dimethylsulfoxide (DMSO) 100% and stored at -20°C . The aliquots were diluted to obtain the desired concentrations before use. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, U.S.A.)

Cell Lines

Human astrocytoma D384 cells were a kind gift from Drs. Mayra Paolillo and Uliana de Simone at the University of Pavia. The cells were tested for mycoplasma contamination and authenticated at the tissue bank of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia E’Dell’Emilia Romagna (IZSLER, Brescia, Italy) using an isoenzyme analysis and a PCR RFLP reaction, as well as authenticated by STR-DNA typing. Human kidney clear cell carcinoma Caki-1 (HTB-46) cells, breast cancer MCF-7 (HTB-22) cells, and lung carcinoma A549 (CCL-185) cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, U.S.A.). D384 cells, Caki-1 cells, MCF-7 cells, and A549 cells were cultured in RPMI-supplemented medium (100 units/mL penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin, 0.25 μ g/mL amphotericin B) with 2 mM L-glutamine with 10% fetal bovine serum (FBS, v/v, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) in a humidified incubator (37°C , 5% CO_2). The doubling times of the Caki-1, MCF-7, A549 cells were established as 24 h, while that for D384 cells was 16 h.

Cell Viability Assay

Cell viability was analyzed using an MTT assay, which is used to assess the viability and/or the metabolic state of the cancer cells based on mitochondrial respiratory activity. A total of 5×10^3 cells were seeded into each well of 96-well plates and allowed to adhere for 24 h. The cells were then treated with the methanol extract *Gynoxys verrucosa* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and DhL (50 μM) for the indicated periods of time. Each concentration/assay was performed in triplicate. Negative control cells were treated with the vehicle DMSO to a final concentration of 0.1% v/v, and positive control cells were treated with Doxorubicin (1 μM) for the indicated time periods.

After incubating the cells with drugs, MTT (5 mg/mL) was added, and the cells were further incubated for 4 h at 37°C. The medium was then aspirated, and the resulting crystals were dissolved in 150 μL of DMSO. The absorbance was measured at 570 nm against the reference wavelength of 650 nm. The fraction of inhibition was calculated based on the following formula: viability (%) = absorbance of treated cells/absorbance of control cells \times 100%.

Observation of Cell Morphological Changes

D384 cells were cultured at a density of 1×10^6 cells/mL in 60 mm culture dishes. After 16 h of attachment, the cells were treated without or with various concentrations of DhL for 6 h, 16 h and 32 h. After treatment, the cells were visualized under an inverted phase-contrast microscope (Nikon) to observe and image the cell morphological changes upon treatment.

Mitotic and Replication Indexes

For mitotic and replication indexes and cell cycle analysis, D384 cells were synchronized. The cells were seeded at 4.8×10^4 cells/well in a 6-well culture plate containing RPMI (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A) media free of FBS for 16 h to force cells into a quiescent state by depriving the cells of nutrients. The cells were then released from the quiescent state by adding fresh medium containing FBS. The cells were treated with DhL for 16 h during which the medium was also supplemented with BrdU (3.24 μM), and after 32 h of culture, colcemid (0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to inhibit cytokinesis. Finally, after 24 h, the cultured cells were incubated in a hypotonic solution (0.075 M KCl) for 30 min (37°C, 5% CO_2) to break the cellular membranes. After fixation (methanol/acetic acid 3:1), the cells were placed onto slides and stained according to the fluorescence plus Giemsa method to differentiate sister chromatids. Microscopic analysis was performed to determine the mitotic index (MI) scoring the number of metaphases in 2000 cells. The proportion of first (M1), second (M2) and third or more (M3) mitotic divisions in 100–200 metaphases was evaluated to determine the replication index (RI) according to the formula $\text{RI} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3}) / \text{total analyzed metaphases}$ [11].

Cell Cycle Analysis

Cell cycle distribution was assessed using propidium iodide (PI) staining. D384 cells were seeded in 60 mm culture dishes (1×10^6 cells) and incubated for 24 h to allow attachment. The cells were then treated with DMSO (0.1% v/v) and DhL (5–10 μM) for 16 h. Only adherent cells were harvested, washed with PBS, and the cell pellets were re-suspended in 100 μL of PBS, fixed with absolute ethanol and stored at -20°C for 24 h. The fixed cells were washed twice with PBS, and the cell pellets were then incubated in a buffer containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton-X-100, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA-ase A for 30 min in the dark at room temperature. The fraction of cells in the G1, S, and G2/M-phases of the cell cycle was then analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.). The data were acquired and analyzed using DIVA software (Becton Dickinson). Integration of

the area under the curve for each of the phases of the histogram was performed with ModFit LT software (Becton Dickinson).

Clonogenic Assay of Cells In Vitro

The cells were seeded in 100 mm Petri dishes at a low density (1×10^4 per dish) and left to adhere for 24 h in standard medium. Increasing concentrations of DhL were added; after 16 h, the cells were washed, treated with trypsin, re-suspended in single-cell suspension, and 100 cells were seeded per plate to determine macroscopic colony formation. After 15 days of growth, colonies were fixed with a 3:1 mixture of methanol/acetic acid and stained with crystal violet. Only colonies consisting of more than 50 cells were scored. The experiments were performed in duplicate on three separate occasions. Three separate experiments were performed in duplicate.

Annexin V-FITC/PI Apoptosis Assay

Flow cytometry analysis was performed to identify and quantify apoptotic cells using an Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit (BD Bioscience). Briefly, the D384 cells were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^5 cells/well. After treatment with varying concentrations of DhL for 16 h, both adherent and floating cells were harvested and stained with Annexin V-FITC/PI according to the manufacturer's procedure. The samples were analyzed with a BD FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson).

Western Blotting Analysis

Total protein extraction, quantification and immunoblots were performed as previously described [12]. Briefly, 20 μ g of total protein were separated by 12–15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (IPVH00010, Immobilon-P, 0.45 μ m, EMD/Millipore, Billerica, Boston, MA, U.S.A.). We used a mouse monoclonal antibody to CDKN1A (p21WAF1/Cip1, clone CP74, raised against the recombinant full-length human protein with N-terminal histidine tag, #05–655, Lot #2299569), a mouse monoclonal antibody to β -actin (MAB1501R, Lot #LV1576007), a mouse monoclonal antibody to total TP53 (clone BP53-12, raised against a recombinant wild type tumor protein p53, #05–224, Lot #2326369), and a mouse monoclonal antibody against α -tubulin (clone AA2, #05–661, Lot #2207268), and all antibodies were obtained from EMD-Millipore. We also used a mouse monoclonal antibody to total TP53 (clone BP53-12, raised against a recombinant wild type tumor protein p53, sc-81168, Lot # C1413), a rabbit polyclonal antibody to phosphorylated p-S46-TP53 (raised against the phospho-Serine 46 peptide, sc-101764, Lot #G0313), a rabbit polyclonal antibody to total TP73 (recognizes all p73 isoforms raised against 1–80 amino acid peptide of human origin, sc-7957, Lot # D2413), a rabbit polyclonal antibody to p-Y99-TP73 (raised against the phospho-Tyrosine 99 peptide, sc-101769, Lot # K2613), a rabbit polyclonal antibody to p-S139-histone γ H2A.X (raised against the phospho-Serine 139 peptide of human origin, sc-101696, Lot # F1814), and a rabbit polyclonal antibody to BAX (P-19, raised against a N-terminal epitope, sc-526, Lot # D0314), and all antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). All primary antibodies were used at the dilutions recommended by the manufacturer for immunoblotting. The appropriate goat anti-rabbit (AP307P) and goat anti-mouse (#AP308P, Lot #LV1560164) horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulins (1:5000; EMD-Millipore) were subsequently used. Immunoreactive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence kit with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce-Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.).

Genotoxicity of Human Lymphocytes

The genotoxicity of DhL was assessed using two technical approaches. First we used the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (CBMN assay). Whole peripheral blood samples were obtained from three healthy donors (age range 20–25 years old). The donors were informed about the purpose of lymphocytes collection and signed a consent form. The heparinized peripheral blood (0.5 mL) was cultured for 72 h at 37°C in 6.3 mL of RPMI-1640 supplemented with 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), and 0.2 mL phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich). After 48 h of culture, cytochalasin B (Sigma-Aldrich) was first added at a final concentration of 6 µg/mL, and then three different concentrations of DhL, dissolved in DMSO, (Sigma-Aldrich) were tested (5, 15 and 25 µM). DMSO and mitomycin C (Sigma-Aldrich) were used as the solvent and positive controls, respectively. Aliquots of control and treated lymphocytes were removed for cell viability assay. The CBMN test was performed as reported elsewhere [13]. For each culture/concentration, 1000 binucleated cells were evaluated for associated micronuclei. Cell proliferation kinetics were analyzed by determining the frequency of mononucleated (Mono), binucleated (Bi) and polynucleated (Poly) cells, corresponding to 0, 1, and 2 or more in vitro cell divisions, respectively. Cytostatic activity was determined by calculating the nuclear proliferation index using the following equation: Nuclear Proliferation Index (NPI) = [#Mono + 2#Bi + 3#Poly]/200 [13].

As a second genotoxicity test, we used a SCGE assay (comet assay). Heparinized blood samples (20 µL) were cultured at 37°C in RPMI 1640 medium (1.0 mL, Sigma-Aldrich) that was supplemented with L-glutamine (2 mM) and non-essential amino acids (10 mM, Gibco), and the samples were treated with various concentrations of DhL dissolved in DMSO (5–35 µM). DMSO and hydrogen peroxide (2.5 µM H₂O₂, Sigma-Aldrich) were used as the solvent and positive controls, respectively. The treated cells were incubated for 3 h at 37°C and then centrifuged. The supernatant was removed, and the pellets were washed with PBS and centrifuged again. The SCGE assay was performed as described elsewhere [14]. The DNA was allowed to unwind for 20 min in electrophoresis running buffer solution (300 mM NaOH, and 1 mM Na₂EDTA, pH 13.0). Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA. Ethidium bromide (60 µL of a 1.5 µg/mL solution) was added to each slide, and a cover glass was placed on the gel; DNA migration was analyzed with a Zeiss Axioskop 2 plus 40 microscope with fluorescence equipment (filter 12) and measured with a scaled ocular. For the evaluation of DNA migration (tail length), 50 cells were scored for each plate.

Statistical Analysis

All data were reported as the means ± SEM of independently performed experiments, as indicated in each figure. The statistical significance was obtained with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnet post-test. Treated cultures were compared to those observed in the ethanol control (GraphPad Prism 4). A $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. The comet data were not normally distributed in our samples; therefore, we compared the group medians using the Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis post-test to evaluate the differences between the compound concentrations and the control. Statistical analyses were carried out in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

Results

DhL Modulated Cell Viability of Cancer Cells

To determine whether DhL could affect tumor cell survival, we used a MTT assay to evaluate the inhibitory activity of the methanol extract of *G. verrucosa* on cell growth. Using four cancer

Table 1. Effect of *G. verrucosa* methanol extract and DhL on the growth of human cancer cell lines.

Treatment	Human cancer cell lines			
	D384 (Cerebral Astrocytoma)	A549 (Lung cancer)	MCF-7 (Breast cancer)	CAKI (Kidney cancer)
<i>Gynoxys verrucosa</i> 50 µg/mL	98.4 ± 1.3	79.3 ± 3.0	68.3 ± 6.3	90.0 ± 1.9
Dehydroleucodine 50 µM	98.9 ± 2.3	70.0 ± 2.9	69.1 ± 4.7	69.3 ± 4.5
Doxorubicin 1 µM	82.6 ± 1.2	74.5 ± 4.4	36.1 ± 3.1	47.8 ± 4.7

^a Standard error.

doi:10.1371/journal.pone.0136527.t001

cell lines (Table 1), we showed that the methanol extract of *G. verrucosa* more effectively inhibited the survival of cerebral astrocytoma D384 cells (Table 1). After subsequent purification of the methanol extract and spectroscopic analysis of the active compound, the sesquiterpene lactone DhL was identified (Fig 1A), and inhibited cell growth of all of the tumor cell lines tested, especially the human astrocytoma D384 cells (Table 1), after 48 h of exposure. D384 astrocytoma cells were selected for further studies.

To examine the cancer cell viability upon DhL exposure, we used a MTT assay with D384 cells treated with the various concentrations of DhL (5, 7.5, 10, 15 and 20 µM) for 16 h (after a replication cycle). We found that the cancer cells were viable up to 10 µM, whereas concentrations of 15 µM and greater resulted in a dramatic decrease in the viability of D384 cells (up to ~40%, Fig 1B). When D384 cells were exposed to various concentrations of DhL for 16 h, morphological changes were observed (Fig 2). The cancer cells treated with the negative control showed the characteristic morphology of the cell line and ~60% density. However, at the 5 µM and 7.5 µM concentrations, a decrease in density was observed, while the cell morphology remained intact. Morphological changes were more obvious at the 10 µM and 15 µM doses. When the cells were exposed to 2 rounds of replication, the density control was ~80%, while the cytotoxic effects were accentuated at 15 µM. These observations, as well as the cell viability data, suggest that DhL displayed distinct effects depending on the concentration used (cytostatic at low concentration and cytotoxic at high concentration).

As shown in Fig 1C, the mitotic index of D384 cells decreased after treatment with DhL in a concentration-dependent manner compared to the negative control (with an index of 0.176, which decreased significantly to 0.055 at the highest tested concentration of 10 µM, $p < 0.0001$). Using a BrdU incorporation assay, we differentiated distinct metaphase division cycles (Fig 1C) and showed that, at the tested concentrations, DhL decreased the fraction of cells in the second and third stages of mitosis, while the amount of cells in the first stage of mitosis was increased (compared to the control), at all concentrations tested (Fig 1D). This effect was confirmed by establishing the rate of replication (Fig 1E), showing that at a concentration of 10 µM, RI is 1.255, which decreased compared to the rate obtained for the negative control (1.875, $p < 0.001$).

DhL Displayed a Cytostatic Effect in D384 Cells through Cell Cycle Arrest and Apoptosis

We tested the effect of DhL on the cell cycle distribution using the same concentrations (5 µM, 7.5 µM and 10 µM) and varying times (6, 16 and 32 h). We showed that the exposure of D384 cells to DhL for 6 h and 16 h induced a significant decrease of the number of D384 cells in S phase compared to the control ($p < 0.0001$) and was accompanied by an increase in the fraction of cells in the G2/M phase at all concentrations (Fig 3). Although the exposure of D384 cells to

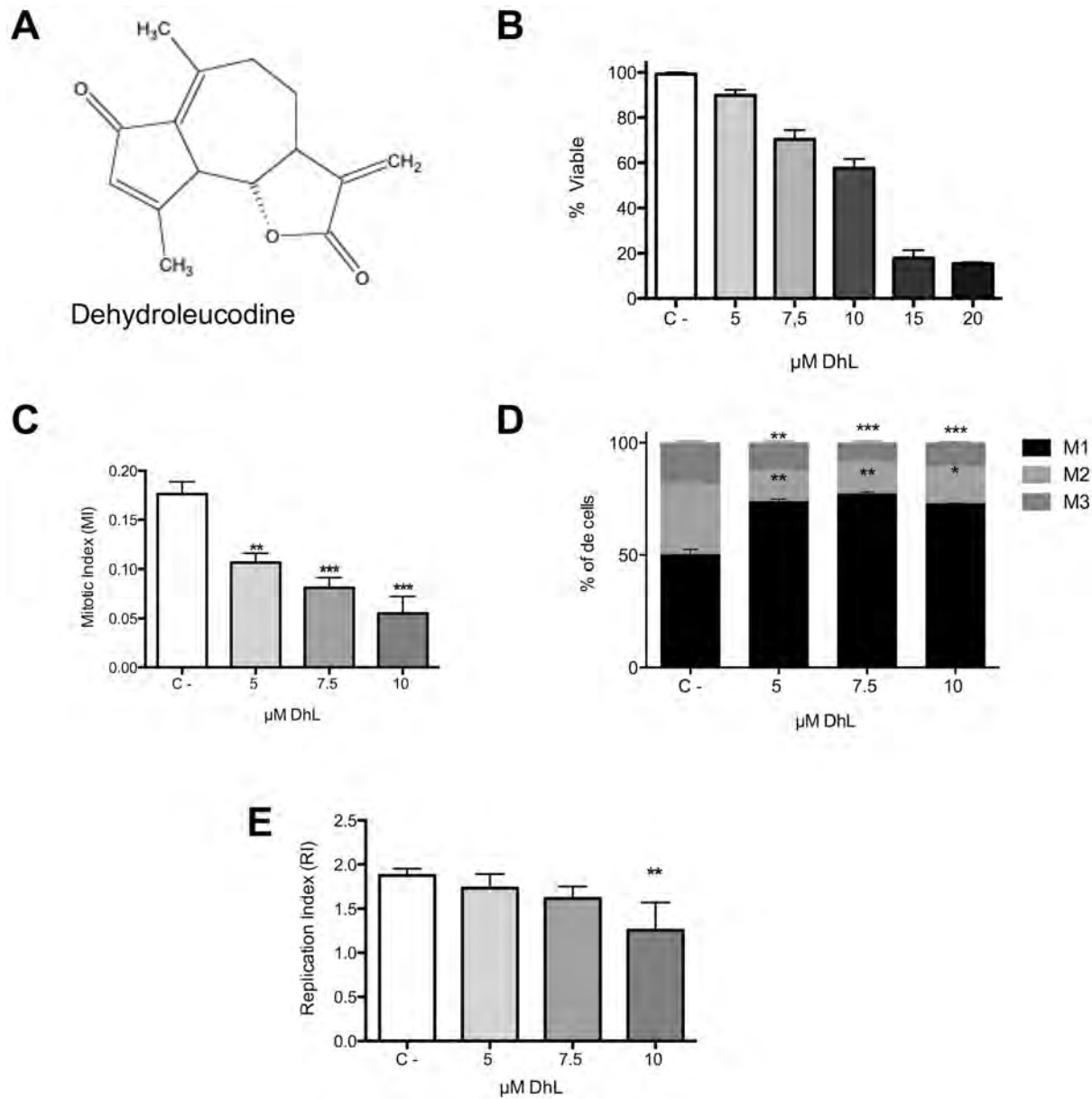


Fig 1. DhL treatment reduced the D384 cell survival. (A). The chemical structure of DhL (B). Analysis of D384 cell viability upon DhL exposure using a MTT assay after 16 h. The x-axis represents the varying concentrations of DhL (5–20 μ M), and C- is the control sample without DhL. (C). D384 Mitotic index (MI) measurement upon DhL exposure (5–10 μ M). (D). The fraction of D384 cells in 1 mitotic (M1), 2 mitotic (M2) and 3 mitotic (M3) stages after treatment with DhL (5–10 μ M, C-, control, DMSO). (E). The replication index (RI) of D384 cells upon exposure to DhL (5–10 μ M). Data represent mean \pm SEM, n = 3. Symbols denote statistically significant differences: ** p<0.01, *** p< 0.001 with respect to (C-) control conditions (DMSO).

doi:10.1371/journal.pone.0136527.g001

DhL concentrations of 5 μ M and 7.5 μ M for 32 h showed no change with respect to the control, the treatment of cells with 10 μ M of DhL for 6 h and 12 h showed a decrease of a number of cells in the G0/G1 phase accompanied by an increase in the number of cells in the G2/M phase.

We further examined the cytotoxic effect of DhL at the higher concentrations (10, 12.5, 15, 17.5 and 20 μ M). Fig 4A–4F shows the results of flow cytometry analysis of D384 cells using the Annexin V-IP assay. We observed that increasing concentrations of DhL induced the D384 cell migration from the quadrant of living cells to the quadrants of early apoptotic cells and late

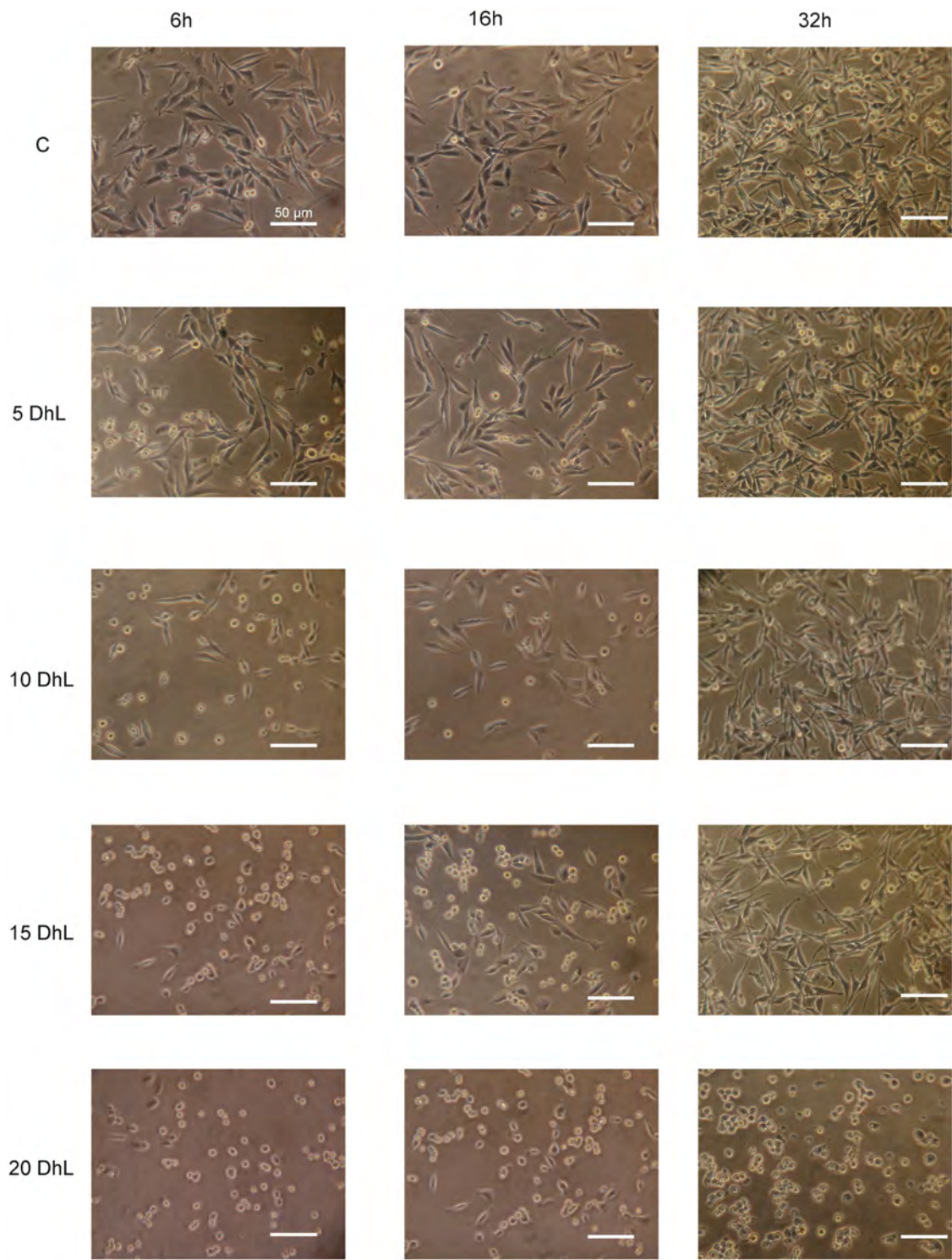


Fig 2. DhL modulated morphological changes in D384 cells. D384 cells were treated with 0, 5, 10, 15 and 20 μM DhL for 6 h, 16 h and 32 h, visualized under microscope and imaged. Magnification: 40X.

doi:10.1371/journal.pone.0136527.g002

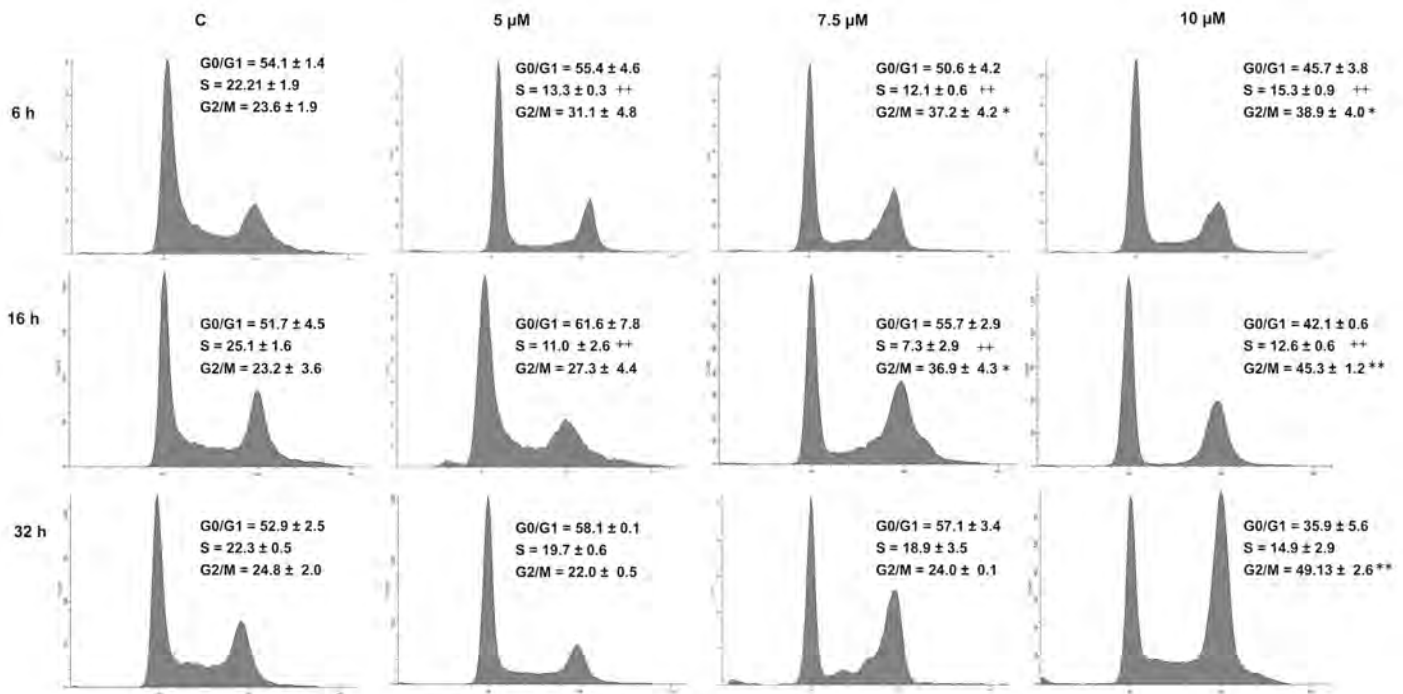


Fig 3. DhL induced cell cycle arrest in D384 cells. Cell cycle analysis. D384 cells were exposed to 0 (C-, control), 5, 7.5 and 10 μM of DhL for 6, 16 and 32 h. The fraction of cells in the G1, S, and G2/M-phases of the cell cycle was then analyzed using a FACSCanto II flow cytometer. Data were acquired and analyzed using DIVA software. A representative histogram is shown for each DhL concentration. Data represent the mean ± SEM, n = 4. Symbols denote statistically significant differences: * p<0.01 and ** p<0.001 with respect to control conditions for G2/M phase and ++ p<0.001 with respect to control conditions for S phase.

doi:10.1371/journal.pone.0136527.g003

apoptotic cells. The fraction of living cells in the control group was 88%, whereas 40.8% of the cells survived at the higher concentration of DhL (Fig 4G). As shown, the rate of the early apoptotic cells in control sample was ~4.8%, which significantly increased after treatment with 17.5 μM DhL (~38.4%) or 20 μM DhL (~33.3%). Simultaneously, the rate of late apoptotic D384 cells exposed to 20 μM DhL (19.5%) also increased when compared with control cells (5.5%) (Fig 4H). Apparently the cytostatic effect was temporary because the removal of DhL resulted in the reversion of D384 cell viability to > 80% at a concentration of 10 μM. Treatment with higher concentrations of DhL maintained the cytotoxic effect; the cell survival of D384 cells did not exceeded ~44% compared to control (Fig 4H).

DhL Induced the Expression of Total p73 and Phosphorylation of p73 and p53 in D384 Cells

Accumulating evidence shows that the p53 family members (p53, p63 and p73) play a fundamental role in the regulation of cell cycle arrest, apoptosis, autophagy and metabolism in cancer cells exposed to stress-inducing and DNA damaging agents of various origins [15, 16]. Therefore, we examined whether DhL-induced apoptotic cell death involved the expression of these transcriptional factors in D384 cells. The notion of the involvement of TP53 family members in the response of cancer cells to DhL was also supported by the initial observations that DhL induced the expression of the cell cycle regulator, CKND1A (p21), a well-known downstream target of all TP53 family members [15, 16]. Using the total lysates obtained from D384 cells treated with the control and increasing concentrations of DhL (12.5, 15 and 17.5 μM for 16 h), we found that the expression of CDKN1A (p21) increased upon DhL exposure in a

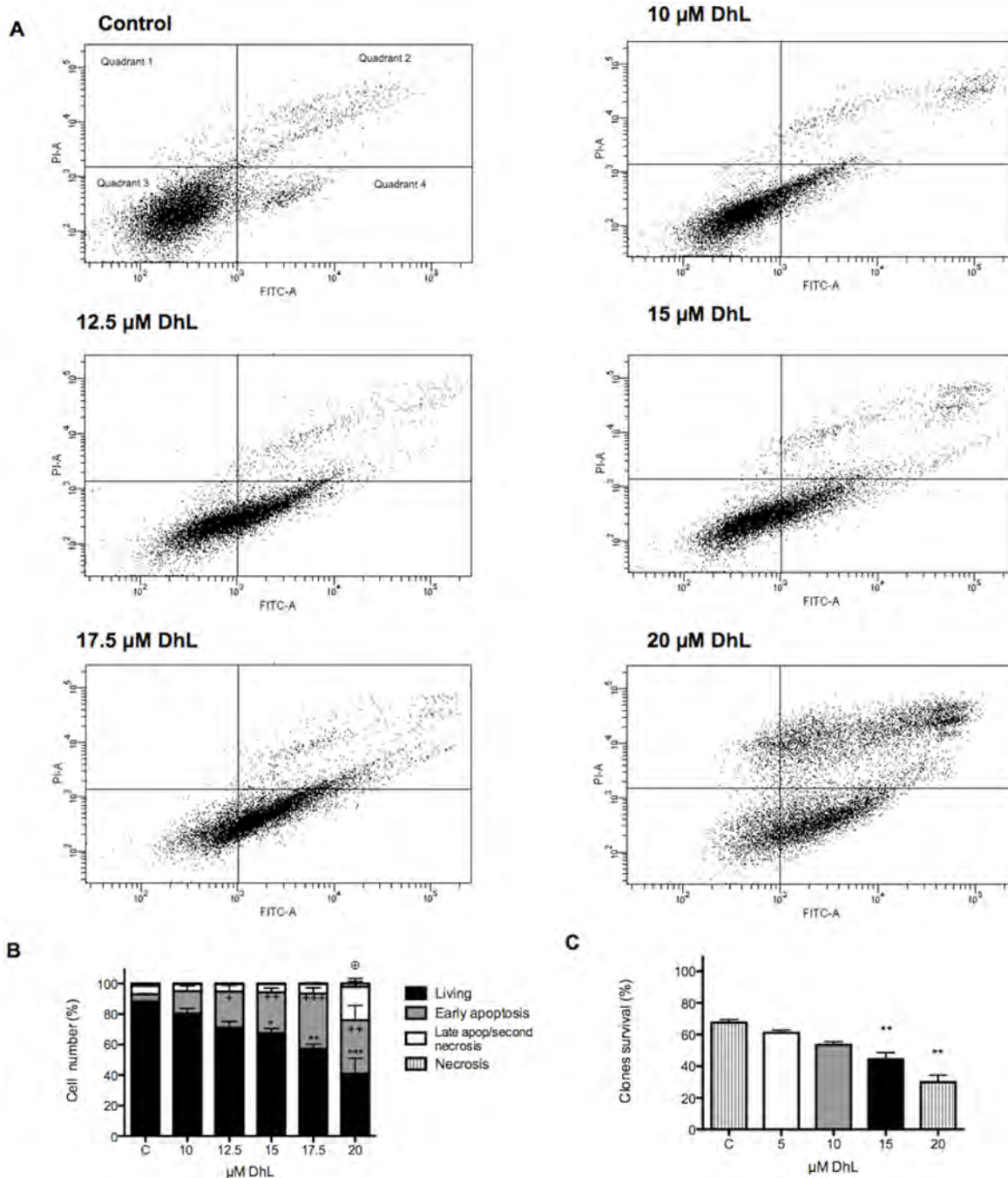


Fig 4. Apoptotic and clonogenic effect of DhL on D384 cells. Apoptotic D384 cells were detected and monitored by Annexin V-FITC/PI staining. (A) A representative histogram is shown for each DhL concentration. Quadrant 1, PI (+) (cells undergoing necrosis); Quadrant 2, Annexin V-FITC (+) and PI (+) (cells in the late apoptosis and secondary necrosis); Quadrant 3, Annexin V-FITC (-) and PI (-) (living cells); Quadrant 4, Annexin V-FITC (+) and PI (-) (cells in the early apoptosis). (B) Apoptotic changes. The fractions of live (black bars), early apoptotic (gray bars), late apoptotic/secondary necrotic (white bars) and necrotic (striped bars) cells are shown. Symbols denote statistically significant differences: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ with respect to control conditions for live cells, + $p < 0.01$, ++ $p < 0.001$ and +++ $p < 0.0001$ with respect to control conditions for early apoptosis, and ⊕ $p < 0.01$ with respect to control conditions for late apoptosis/secondary necrosis. (C) Clonogenic assay. Cells were treated with DhL for 16 h. The number of counted colonies was expressed as a fraction of the control (defined as 100%). Symbols denote statistically significant differences: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. control. Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 4$) of 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0136527.g004

concentration-dependent manner (Fig 5). We further found that another downstream target of the TP53 family, the apoptotic activator BAX, was also up regulated in D384 cells upon DhL exposure (Fig 5). The increased levels of the proapoptotic BAX protein supports the apoptotic mechanism implicated in the DhL response, whereas the increase in phosphorylated levels of γ -H2AX (p139-H2AX) suggests the genotoxic effect of DhL in D384 cells.

We next observed that while the expression of total TP53 was not changed in D384 cells treated with increasing concentrations of DhL, the total level of TP73 was increased (Fig 5). Moreover, we also showed that levels of phosphorylated S46-p-TP53 and Y99-p-TP73 were also increased upon the D384 astrocytoma cell response to DhL (Fig 5). These observations supported the hypothesis that the death observed in D384 cells upon DhL exposure is likely regulated by p73 and perhaps through S46-p-p53 and Y99-p-p73 as well.

DhL Displayed Cytostatic/Genotoxic Activities in Human Lymphocytes

As with all sesquiterpene lactones, DhL can interact with DNA and proteins [17], leading us to further examine the potential genotoxic effects of DhL in control lymphocytes using in vitro genotoxicity assays (CBMN assay and comet assay). To establish working subtoxic concentrations for genotoxicity testing, the cytotoxic effect of DhL on human lymphocyte proliferation was assessed with fluorescein diacetate (FDA)/ethidium bromide staining. Lymphocytes were exposed to DhL for 24 h and showed no decrease in viability at any of the concentrations tested, unlike cancer cells (Fig 6A). We assessed the effect of DhL treatment on the kinetics of lymphocyte cell proliferation (CPK) and calculated the nuclear division index (NDI) using both parameters (CPK and NDI) as cytostatic criteria for human lymphocyte proliferation. The effects of DhL on cell proliferation were evaluated by counting the proportion of mononucleated, binucleated, and polynucleated cells. Exposure of lymphocytes to DhL for 24 h resulted in an increased fraction of mononuclear cells, while the fraction of multinucleated cells decreased (Fig 6B). Furthermore, DhL decreased the proliferation of lymphocytes as assessed by NDI, suggesting that DhL acts as a cytostatic agent in normal lymphocytes (Fig 6C).

When we assessed lymphocyte proliferation in binucleate cells as described elsewhere [13], where the genotoxic effect was determined based on the frequency of micronuclei, we observed that DhL (starting from 5 μ M) increased the micronuclear frequency (Fig 6D). In the comet assay, lymphocytes were exposed to various concentrations of DhL for 3 h and the length of the “comet” tail was measured (Fig 6E). With this assay, we observed that the exposure of lymphocytes to DhL statistically increased the migration of the comet tail at 25 μ M (Fig 6E).

Discussion

Historically, natural products from plants and animals were the source of virtually all medicinal preparations and, more recently, natural products have continued to enter clinical trials or to provide leads for compounds that have entered clinical trials, particularly as anticancer [18–21]. The search for anticancer drugs has been governed by the fact that cancer cells replicate more rapidly than normal cells, and the vast majority of the currently used drugs cause DNA damage, thereby interrupting cell division and subsequently causing cell death [22, 23]. Bioactive phytochemicals with lesser toxic effects are widely available in the natural habitats of many countries, especially in the diverse Amazonian flora in South America [23]. These phytochemicals, derived from plants, fungi, marine organisms, modulate multiple molecular targets and affect a number of signaling and regulatory pathways, which ultimately leads to tumor cell death via cell cycle arrest, apoptosis or necrosis [24–43]. Phytochemicals are functionally pleiotropic and may affect multiple intracellular targets and different cell signaling processes that are usually altered in cancer cells with limited toxicity in normal cells [24, 33]. The

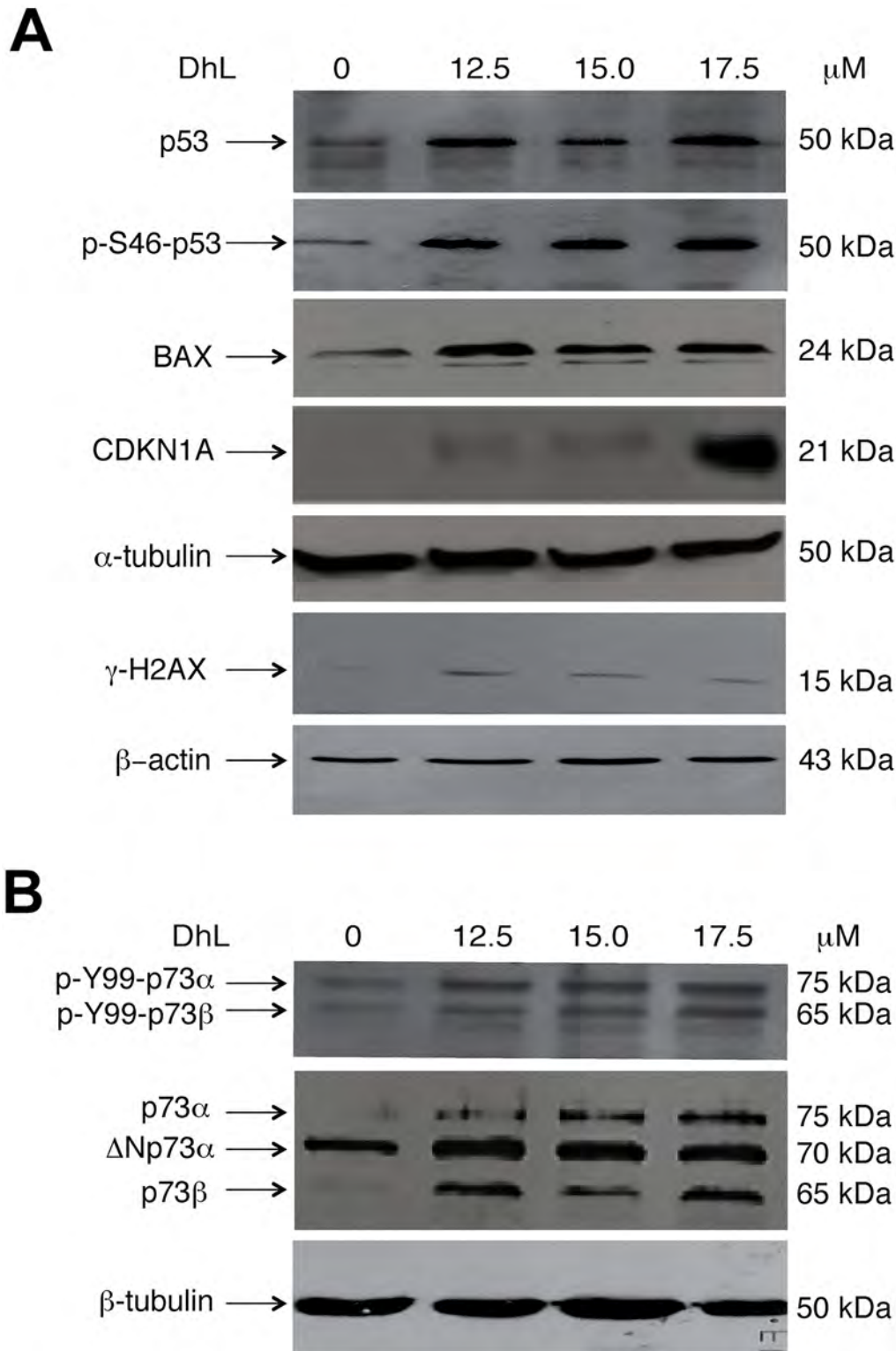


Fig 5. DhL induced the expression of proteins involved in cell cycle arrest and the apoptotic response of D384 cells. D384 cells were exposed to 12.5, 15 and 17.5 μM DhL for 16 h. Total protein lysates were separated by 12–15% SDS-PAGE followed by western blot analysis with the indicated antibodies against BAX, CDKN1A, TP53, S46-p-TP53, and p139- γ H2AX, as shown in Panel A, and TP73 and Y99-p-TP73, as shown in Panel B. α -Tubulin and β -actin were used as loading controls for total cell extracts.

doi:10.1371/journal.pone.0136527.g005

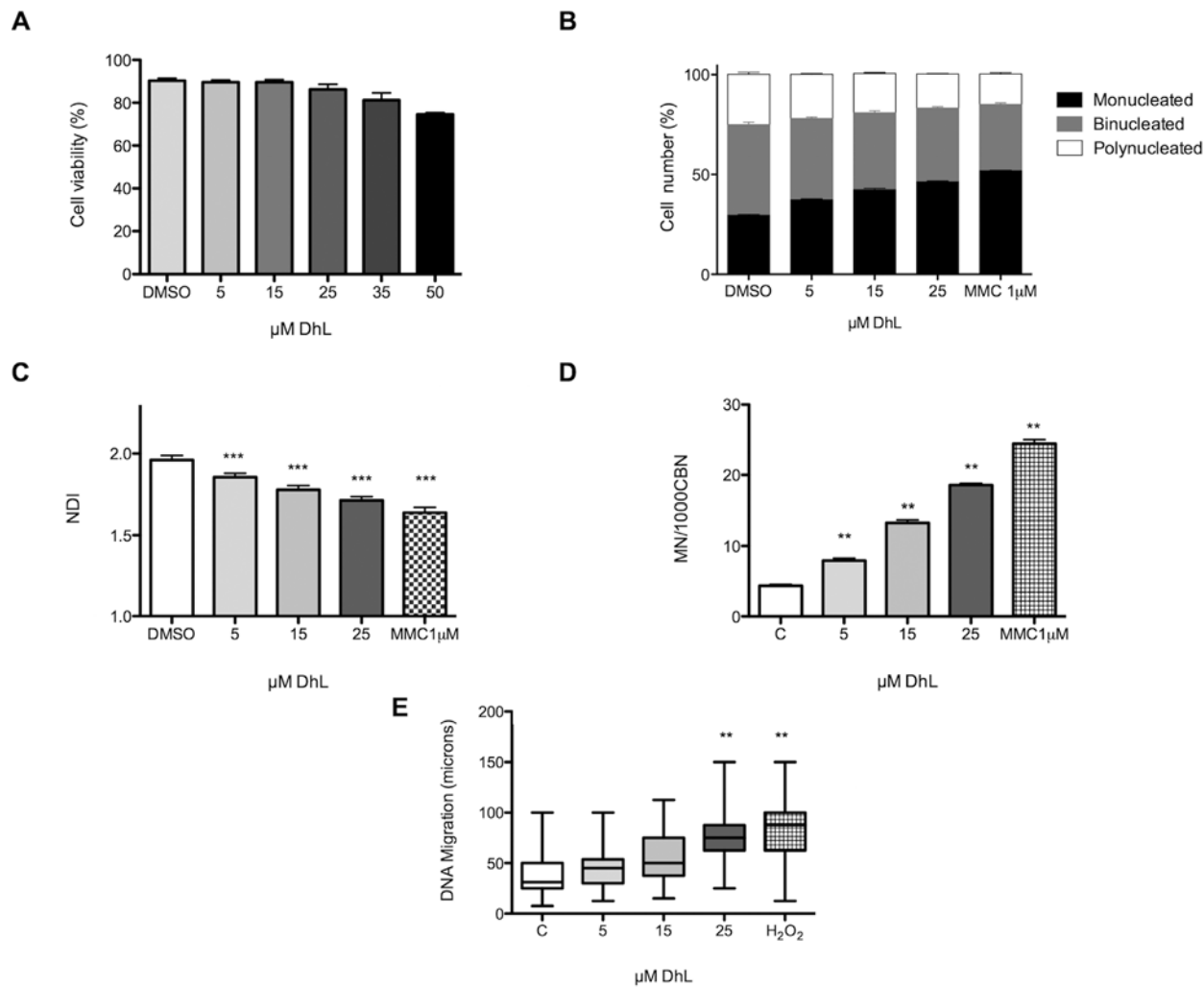


Fig 6. DhL induced cytostatic and genotoxicity effects in human lymphocytes. Lymphocytes were exposed to DhL (5, 15, 25, 35 and 50 μM). (A) Cell viability assay. (B) Proliferation kinetics of lymphocytes. (C) Nuclear division index (NDI) assay. The fraction of mononucleated (black bars), binucleated (grey bars) and polynucleated (white bars) cells are shown. ANOVA-Dunnet: * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$. (D) Micronucleus frequency (MN) on binucleated cells. As a reference, we used lymphocytes treated with 1 μM Mitomycin C (MMC) (square bars) ANOVA-Dunnet: ** $p < 0.001$. (E) Comet assay. The tests for significance were limited to the Kruskal–Wallis one-way ANOVA-Bonferroni on ranks. (** $p < 0.001$). The data are represented as the mean (\pm SEM) of three duplicated experiments from three donors.

doi:10.1371/journal.pone.0136527.g006

simultaneous targeting of multiple pathways may help to kill cancer cells and slow the onset of drug resistance [38, 39, 44].

Several preclinical investigations have shown that certain natural phytochemicals, such as curcumin, resveratrol, timosaponin III, gallic acid, diosgenin, pomegranate, epigallocatechin gallate, genistein and 3,3'-diindolylmethane, inhibit the mTOR pathway directly or indirectly [43]. D-pinitol is a naturally occurring compound derived from soy that significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells in a concentration-dependent manner. These phenotypic changes coincided with the increased expression of TP53 and BAX, as well as the down regulation of BCL2 and NF- κ B, thereby inducing cell death through an apoptotic mechanism [45]. The plant-derived berberines are shown to be cytotoxic to human colon cancer cells and are more effective on cells harboring wild type TP53 in which they promote cell cycle arrest and

DNA damage, as well as trigger caspase-dependent apoptosis and drive autophagy [46]. The DNA topoisomerase I inhibitor β -lapachone is one of the phytometabolites that induces a cell-cycle delay at G1/S phase before inducing either apoptotic or necrotic cell death in a variety of human carcinoma cancers [47].

The current study describes the ability of the phytometabolite DhL, from the species *G. verrucosa* that is grown in the certain areas of South Ecuador, to inhibit tumor cell growth *in vitro*. Among the four tumor cell lines tested, we observed that the most sensitive to DhL exposure was the D384 astrocytoma cell line. We found that both extracts from *G. verrucosa* biomass and purified DhL negatively affected the survival of D384 cells *in vitro*. Additionally, we found that DhL could induce both cell cycle arrest and apoptosis in D384 astrocytoma cells in a concentration-dependent manner. We further found that the concentrations at which DhL was cytotoxic to D384 cancer cells did not harm normal human lymphocytes. At low concentrations, DhL induced a cytostatic effect, similar to that reported for sesquiterpene lactones such as Parthenolide, Deoxyelephantopin, Isodeoxyelephantopin and Costunolide [48–51]. This effect was also consistent with the anti-proliferative effects reported for DhL and 11,13-dihydro-dehydroleucodine on vascular smooth muscle cells, as well as Dehydroparishin-B on melanoma B16 cells [52, 53]. At high concentrations, the apoptotic effect of DhL on D384 cells was found to be similar to that observed in MCF-7 breast cancer cells and HeLa cervical-uterine cancer cells [54].

The molecular mechanisms that regulate the cell cycle and apoptosis are closely related; thus, a number of proteins that control cell cycle progression may also induce apoptosis under conditions in which cell cycle progression is not adequately developed [55, 56]. We observed that the DhL-induced cell death phenotype is associated with the increasing expression of the transcription factor TP73, the apoptotic activator BAX and the cell cycle inhibitor CDKN1A (p21), as well as with the increasing phosphorylation of TP53 and TP73 at the S46 and Y99 amino acid residue, respectively. Finally, we found that DhL induced the phosphorylation of the DNA damage marker, γ -H2AX (p-S139-H2AX).

The latter observation that specific post-translational modifications of TP53 and TP73 in D384 cells upon DhL exposure strengthens the idea that DhL induces apoptotic machinery, because these phosphorylation events are often associated with the pro-apoptotic activities of TP53 and TP73 [57–62]. c-ABL phosphorylates TAp73 α on tyrosine Y99, which is a necessary step for the pro-apoptotic activity of TP73 and its ability to transcriptionally activate BAX. This phosphorylation subsequently leads to the translocation of BAX to the mitochondria to induce cytochrome c release from the mitochondria [57–59].

Many chemotherapeutic drugs induce the expression of TP73, which in turn enhances drug-induced TP73-dependent apoptosis. Several studies have shown the involvement of TP73 in response to phytometabites [63]. 4-(39,39-dimethylallyloxy)-5-methyl-6-methoxyphthalide (MP) was obtained from the liquid culture of *Pestalotiopsis photiniae* isolated from the Chinese Podocarpaceae plant *Podocarpus macrophyllus*. Flow cytometry showed that MP induced G1 cell cycle arrest and apoptosis, as well as apoptotic morphology of cancer cells in a concentration-dependent manner [63]. The expression of the TP73 protein was increased after treatment with various MP concentrations [63]. The cell cycle-related genes, CDKN1A, CDKN2A and GADD45A, and the apoptotic regulator BIM, were significantly upregulated upon MP exposure [63].

The tumor cell death phenotype induced by DhL could largely be related to DNA damage, as indicated by micronuclei and comet assays. The increase in CDKN1A and γ -H2AX expression in D384 cells upon DhL exposure also indicated cell cycle arrest and DNA damage response of cancer cells, in which DhL would induce DNA repair mechanisms. Because of the potential failure of DNA repair machinery, the cancer cells are forced to enter the process of

apoptotic cell death as shown by the increasing expression of BAX, which has been reported in other studies [20]. Overall, our results support the idea that *G. verrucosa* extract and purified DhL can inhibit the growth of the tumor lines, particularly of D384 astrocytoma cells, by activating cell cycle arrest and apoptosis through a TP73-dependent mechanism. The active substance, DhL, was shown to display both cytostatic and cytotoxic activities, as well as the genotoxic effects, in D384 cells in a concentration-dependent manner. The molecular events underlying these effects include, but are not limited to, TP73, p-TP73, p-TP53, CDKN1A, and BAX-dependent pathways. Further in-depth studies are needed to pinpoint other numerous players involved in the effects of DhL to fully understand the molecular landscape underlying the response of cancer cells to phytometabolite DhL.

Supporting Information

S1 Fig. NMRs Spectrum correspond to the dehydroleucodine.
(PDF)

Acknowledgments

We appreciate the technical support of M. Sordo, J. L. Ventura, I. Mitre, H. Cabrera, M. Ramirez and R. Cueva. We would like to thank Dr. Luis Miguel Romero (UTPL) for the continuous support and invaluable advice during this study and preparation of the manuscript. N.B. M. acknowledges that this paper was a part of her doctoral thesis in the “Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.” E.A.R is a Distinguished Professor of the Prometeo Project of the Secretariat for Higher Education, Science, Technology and Innovation (SENESCYT) of the Republic of Ecuador.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NBM EAR AZD POW. Performed the experiments: NBM GGA GVR OM. Analyzed the data: NBM AZD OM GV EAR POW. Contributed reagents/materials/analysis tools: NBM GVR AZD POW. Wrote the paper: NBM EAR POW.

References

1. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 2009; 109: 3012–3043. doi: [10.1021/cr900019j](https://doi.org/10.1021/cr900019j) PMID: [19422222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19422222/)
2. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3670–3695. doi: [10.1016/j.bbagen.2013.02.008](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008) PMID: [23428572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23428572/)
3. Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Disc. Today* 2010; 15: 668–678.
4. Fraga BM. Natural sesquiterpenoids. *Nat Prod Reps* 2007; 24: 1350–1381.
5. Tene V, Malagon O, Finzi P. V, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe, Ecuador. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 63–81. PMID: [17137737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17137737/)
6. Ordóñez PE, Quave CL, Reynolds WF, Varughese KI, Berry B, Breen PJ, et al. Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 1055–1059. doi: [10.1016/j.jep.2011.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.012) PMID: [21782013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21782013/)
7. Brengio SD, Belmonte SA, Guerreiro E, Giordano OS, Pietrobon EO, Sosa MA. The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 2000; 86: 407–412. PMID: [10780563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10780563/)
8. Penissi A, Giordano OS, Guzman JA, Rudolph MI, Piezzi R.S. Chemical and pharmacological properties of dehydroleucodine, a lactone isolated from *Artemisia douglasiana* Besser. *Mol Med Chem* 2006; 10: 1–11.

9. Guardia T, Juarez AO, Guerreiro E, Guzmán JA, Pelzer L. Anti-inflammatory activity and effect on gastric acid secretion of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 195–198. PMID: [12963142](#)
10. Valencia R. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2000.
11. Rojas E, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Montero R, Rodríguez R, et al. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* 1993; 4: 637–640. PMID: [8298163](#)
12. Ventura ÂL, Sa L, Montan LF, Lo R. Ceramide mimics tumour necrosis factor- α in the induction of cell cycle arrest in endothelial cells Induction of the tumour suppressor p53 with decrease in retinoblastoma protein levels. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4325–4333. PMID: [10880954](#)
13. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Prot* 2007; 2: 1084–1104.
14. Sordo M, Herrera L, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. Cytotoxic and genotoxic effects of MMA and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Terat Carcin Mutag.* 2001; 21: 249–260.
15. Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 1998; 58: 5061–5065. PMID: [9823311](#)
16. Lokshin M, Tanaka T, Prives C. Transcriptional regulation by p53 and p73. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 121–128. PMID: [16869745](#)
17. Lee KH, Huang ES, Piantadosi C, Pagano JS, Geissman TA. Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. *Cancer Res* 1971; 31: 1649–1654. PMID: [4330633](#)
18. Bhanot A, Sharma R, Noolvi MN. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *Inter J Phytomed* 2011; 3: 9–26.
19. Wang J, Jiang YF. Natural compounds as anticancer agents: Experimental evidence. *World J Exp Med* 2012; 2: 45–57. PMID: [24520533](#)
20. Wang H, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Lee JH, et al. Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 1281–1305. PMID: [22583408](#)
21. Harvey AL, Edrada-Ebel R, & Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015; 14(2), 111–129. doi: [10.1038/nrd4510](#) PMID: [25614221](#)
22. Zhivotovsky B, Kroemer G. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 752–762. PMID: [15340382](#)
23. Bailón-Moscoso N, Romero-Benavides JC, Ostrosky-Wegman P. Development of anticancer drugs based on the hallmarks of cancer cells. *Tumour Biol* 2014; 35: 3981–3995. doi: [10.1007/s13277-014-1649-y](#) PMID: [24470139](#)
24. Pratheeshkumar P, Sreekala C, Zhang Z, Budhraj A, Ding S, Son YO, et al. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 1159–1184. PMID: [22583402](#)
25. Shukla S, Meeran SM, Katiyar SK. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 2014; 355: 9–17. doi: [10.1016/j.canlet.2014.09.017](#) PMID: [25236912](#)
26. Lee WL, Huang JY, Shyr LF. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 925804. doi: [10.1155/2013/925804](#) PMID: [24454991](#)
27. Lenzi M, Fimognari C, Hrelia P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Cancer Treat Res* 2014; 159: 207–223. doi: [10.1007/978-3-642-38007-5_12](#) PMID: [24114482](#)
28. Russo GL, Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Iannitti R, et al. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer Treat Res.* 2014; 159: 185–205. doi: [10.1007/978-3-642-38007-5_11](#) PMID: [24114481](#)
29. Madka V, Rao CV. Anti-inflammatory phytochemicals for chemoprevention of colon cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2013; 13: 542–557. PMID: [23597198](#)
30. Jones V, Katiyar SK. Emerging phytochemicals for prevention of melanoma invasion. *Cancer Lett.* 2013; 335: 251–258. doi: [10.1016/j.canlet.2013.02.056](#) PMID: [23474498](#)
31. Jaganathan SK, Supriyanto E. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. *Molecules.* 2012; 17: 6290–6304. doi: [10.3390/molecules17066290](#) PMID: [22634840](#)
32. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Anticancer antioxidant regulatory functions of phytochemicals. *Curr Med Chem* 2011; 18: 2315–2338. PMID: [21517750](#)

33. Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 211–218. doi: [10.1038/nrc3017](https://doi.org/10.1038/nrc3017) PMID: [21326325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21326325/)
34. Lee KM, Lee KW, Byun S, Jung SK, Seo SK, Heo YS, et al. 5-deoxykaempferol plays a potential therapeutic role by targeting multiple signaling pathways in skin cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010; 3: 454–465.
35. Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer* 2009; 8: 100. doi: [10.1186/1476-4598-8-100](https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-100) PMID: [19909554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19909554/)
36. Kaur M, Agarwal R. Transcription factors: molecular targets for prostate cancer intervention by phytochemicals. *Curr. Cancer Drug Targets* 2007; 7: 355–367. PMID: [17979630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17979630/)
37. Fan S, Meng Q, Auborn K, Carter T, Rosen EM. BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2006; 94: 407–426. PMID: [16434996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16434996/)
38. Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal R. Phytochemicals as cell cycle modulators—a less toxic approach in halting human cancers. *Cell Cycle* 2002; 1: 156–161. PMID: [12429925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12429925/)
39. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div* 2008; 3: 14. doi: [10.1186/1747-1028-3-14](https://doi.org/10.1186/1747-1028-3-14) PMID: [18834508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18834508/)
40. Wang L, Liu D, Ahmed T, Chung FL, Conaway C, Chiao JW. Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *Int J Oncol* 2004; 24: 187–192. PMID: [14654956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14654956/)
41. Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 2927–2936. PMID: [11420705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420705/)
42. Shukla S, Meeran SM, Katiyar SK. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 2014; 355: 9–17. doi: [10.1016/j.canlet.2014.09.017](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.017) PMID: [25236912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25236912/)
43. Tan HK, Moad AI, Tan ML. The mTOR signalling pathway in cancer and the potential mTOR inhibitory activities of natural phytochemicals. *As Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 6463–6475.
44. Shu L, Cheung KL, Khor TO, Chen C, Kong AN. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metas Rev* 2010; 29: 483–502.
45. Rengarajan T, Nandakumar N, Rajendran P, Haribabu L, Nishigaki I, Balasubramanian MP. D-pinitol promotes apoptosis in MCF-7 cells via induction of p53 and Bax and inhibition of Bcl-2 and NF-B. *As Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 1757–1762.
46. Ortiz LM, Tillhon M, Parks M, Dutto I, Prosperi E, Savio M, et al. Multiple Effects of Berberine Derivatives on Colon Cancer Cells. *BioMed Res Inter* 2014; 2014: 924585.
47. Park EJ, Min KJ, Lee TJ, Yoo YH, Kim YS, Kwon TK. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1230. doi: [10.1038/cddis.2014.202](https://doi.org/10.1038/cddis.2014.202) PMID: [24832602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24832602/)
48. Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG. Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J Biol Chem* 2002; 277: 38954–38964. PMID: [12151389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12151389/)
49. Kabeer FA, Sreedevi GB, Nair MS, Rajalekshmi DS, Gopalakrishnan LP, Kunjuraman S, et al. Antineoplastic effects of deoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*, on lung adenocarcinoma (A549) cells. *J Integr Med* 2013; 11: 269–277. doi: [10.3736/jintegmed2013040](https://doi.org/10.3736/jintegmed2013040) PMID: [23867245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23867245/)
50. Hiradeve SM, Rangari VD. A review on pharmacology and toxicology of *Elephantopus scaber* Linn. *Nat Prod Res* 2014; 28: 819–830. doi: [10.1080/14786419.2014.883394](https://doi.org/10.1080/14786419.2014.883394) PMID: [24499355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24499355/)
51. Rasul A, Bao R, Malhi M, Zhao B, Tsuji I, Li J, et al. Induction of apoptosis by costunolide in bladder cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Molecules*. 2013; 18: 1418–1433. doi: [10.3390/molecules18021418](https://doi.org/10.3390/molecules18021418) PMID: [23348995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348995/)
52. Polo LM, Castro CM, Cruzado MC, Collino CJ, Cuello-Carrión FD, Ciocca DR, et al. 11,13-dihydrodehydroleucodine, a derivative of dehydroleucodine with an inactivated alkylating function conserves the anti-proliferative activity in G2 but does not cause cytotoxicity. *Eur J Pharm* 2007; 556: 19–26.
53. Priestap H, Galvis A, Rivero N, Costantino V, Lopez L, Barbieri MA. Dehydroleucodine and dehydroparishin-B inhibit proliferation and motility of B16 melanoma cells. *Phytochem Lett* 2012; 5: 581–585.
54. Costantino VV, Mansilla SF, Speroni J, Amaya C, Cuello-Carrión D, Ciocca DR, et al. The sesquiterpene lactone dehydroleucodine triggers senescence and apoptosis in association with accumulation of DNA damage markers. *PLoS One* 2013; 8: e53168. doi: [10.1371/journal.pone.0053168](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053168) PMID: [23341930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23341930/)

55. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342–348. PMID: [11357141](#)
56. Sinha R, El-Bayoumy K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 13–28. PMID: [14965264](#)
57. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2004; 279: 8076–8083. PMID: [14634023](#)
58. Wang JY. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*. 2000; 19: 5643–5650. PMID: [11114745](#)
59. Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*. 1999; 399: 814–817. PMID: [10391251](#)
60. Mayo LD, Seo YR, Jackson MW, Smith ML, Rivera Guzman J, Korgaonkar CK, et al. Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem* 2005; 280: 25953–25959. PMID: [15843377](#)
61. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. Nishimori H p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000; 102: 849–862. PMID: [11030628](#)
62. Smeenk L, van Heeringen SJ, Koeppel M, Gilbert B, Janssen-Megens E, Stunnenberg HG, et al. Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation. *PLoS One* 2011; 6: e17574. doi: [10.1371/journal.pone.0017574](#) PMID: [21394211](#)
63. Chen C, Yang RL. A phthalide derivative isolated from endophytic fungi *Pestalotiopsis photiniae* induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human HeLa cells. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46: 643–649. doi: [10.1590/1414-431X20132979](#) PMID: [23903687](#)

Phytochemical study and evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia latipes* leaves

Natalia Bailón-Moscoso^{a, b}, Juan C Romero-Benavides^{c, d}, Monserrat Sordo^a, Javier Villacís^b, Ronald Silva^d, Luisa Celi^b, Mariano Martínez-Vázquez^c, Patricia Ostrosky-Wegman^{a*}

^aDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

^bDepartamento de Ciencias de la Salud, Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.

^cInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

^dDepartamento de Química, Sección de Química Básica y Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.

*Correspondence: Patricia Ostrosky-Wegman – e-mail: ostrosky@biomedicas.unam.mx

Received 6 March 2015; Accepted 2 August 2015

ABSTRACT

Some species of the *Clusia* genus have been shown to have important biomedical properties, including the ability to inhibit tumor growth *in vitro* and the usefulness for skin care. In this study, we examined the cytotoxic effect of hexane, ethyl acetate and methanol extracts from *Clusia latipes* Planch. & Triana, Clusiaceae, leaves on survival of human prostate cancer cells (PC-3), colon cancer cells (RKO), astrocytoma cells (D-384), and breast cancer cells (MCF-7). The ethyl acetate extract displayed the most substantial cytotoxic effect. However, using a Comet assay, we observed

that the hexane extract induced a genotoxic effect (DNA damage) on human lymphocytes in an *in vitro* model. Chromatographic purification of the *C. latipes* hexane extract led to the isolation and identification of friedelin, friedolan-3-ol, and hesperidin as active cytotoxic compounds in hexane extract, while β -amyrine was identified as an active cytotoxic compound in the ethyl acetate extract of *C. latipes*, thereby supporting further studies of the molecular mechanisms underlying the effect of these secondary metabolites on cancer cell survival.

Keywords: Anti-cancer phytometabolites, *Clusia latipes*, cytotoxicity, genotoxicity, Comet assay.

Introduction

The Clusiaceae family, also known as Guttiferae, consists of tropical plants and includes approximately 27 genera and 1,090 species (Stevens, 2007). The flora of Southern Ecuador includes a large number of species that belong to the family Clusiaceae. The most representative and important genus is *Clusia*, which is known for its useful biomedical properties. The species of this genus have various biological activities, demonstrating their role as a promising source of active biomedical phytochemicals/phytometabolites that can be used for antimicrobial (Suffredini et al., 2006), anticancer (Díaz-Carballo et al., 2012 and Monks et al., 2002), antioxidant (Ferreira et al., 2014), anti-inflammatory, and antihepatotoxic activities. Furthermore, members of the *Clusia* family have been shown to have an inhibitory effect on human immunodeficiency virus (HIV) (Huerta-Reyes et al., 2004 and Balunas and Kinghorn, 2005). The most prominent biomedical applications of these species include the treatment of leprosy and headaches, treatment of warts, and the control of obesity (Hemshekhar et al., 2011). Leaves of *Clusia* sp. are often used to soften the skin and have a potential benefit in skin care (Valadeau et al., 2010). Because this genus presents great variability in terms of biological activities, it presents an interesting source of active secondary metabolites to be used for their potential antitumor activities. In the present study, we performed a chemical composition analysis of the active phytometabolites obtained from organic

extracts of the leaves of *Clusia latipes*, as well as an evaluation of the cytotoxic and genotoxic activities of these extracts on human cancer cell lines and human lymphocytes.

Materials and methods

Plant material

A total of 10.6 Kg of leaves and stems of *Clusia latipes* Planch. & Triana, Clusiaceae, were collected in Gonzanama-Quilanga (0° 57' 46" Lat. S, 77° 11' 46" Long. O, 2300 m.a.s.l) region of the Loja Province of Ecuador. A sample specimen (PPN-CI 002) was deposited and identified in the Herbarium of Departamento de Química of the Universidad Técnica Particular of Loja, Ecuador. Plant material was dried at 30°C for seven days in dryer trays with air flow, and then was reduced to fine particles by manual grinding to a suitable size.

Preparation of extracts

The dried and ground leaves (1540 g) were macerated at room temperature, with hexane (*Clusia latipes* Hex), ethyl acetate (*Clusia latipes* EtOAc), and methanol (*Clusia latipes* MeOH) sequentially for three days with three liter of each solvent, the procedure was repeated three times. The extract were filtered using filter paper, all extracts were concentrated under reduced pressure, and subsequently stored at room temperature and protected from light until further use. For biological studies, stock solutions (1000 µg/ml) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. The aliquots were diluted to obtain the appropriate concentrations before use.

Isolation of secondary metabolites

To separate the components from the *Clusia latipes* extracts: Hex (39 g), EtOAc (28 g) and MeOH (50 g), and a silica gel-60 F254 chromatography column (CC, Merck) were used. Mixtures of these three solvents were used in polarity up to starting with hexane (100%) to obtain the compound

separation. Fractions of 200 ml each were collected using a vacuum pump, the solvent was then removed on a rotary evaporator and the residue was recovered with dichloromethane. Thin layer chromatography (TLC) was performed on each fraction for detection of the compounds. Compounds were visualized by spraying with ceric sulfate solution in acid sulfuric followed by heating on a hot plate. Fractions with a similar profile were pooled and purified by conventional procedures: solvents pair technique and micro columns.

The hexane extract (39 g) was submitted to column chromatography eluted with mixtures of three solvents Hex, EtOAc and MeOH were used in polarity up to starting with hexane (100%) to obtain the compound separation, resulting in 428 fractions of 200 ml each. The eluted fractions were evaluated and pooled according to TLC analysis, affording 108 fractions (F-1 to F-108). F-13 was presented as a yellow amorphous material submitted to recrystallization with methanol, obtaining in the end of the process a white amorphous solid, which was identified as friedelin (**1**). The fraction F-32 eluted with Hex:EtOAc 80:20 (v/v), was present as an amorphous solid, it was recrystallized with methanol, identified as friedolan 3-ol (**2**). The fraction F-72 were fractionated by silica gel-60 F254 chromatography column at 1:10 compound: silica gel and EtOAc:MeOH (80:20) as eluent, resulting a yellow amorphous solid identified as hesperidin (**3**). From the extract using EtOAc (28 g), 309 fractions were obtained. The eluted fractions were evaluated and pooled according to TLC analysis, affording 90 fractions (F-1 to F-90), from fraction F-18, eluted with Hex:EtOAc 90:10 (v/v) a amorphous solid was presented, it was recrystallized with methanol obtaining in the end of the process a white amorphous solid, which was identified as β -amyrine (**4**). From the MeOH extract (50 g), 478 fractions were obtained, the eluted fractions were evaluated and pooled according to TLC analysis, affording 127 fractions (F-1 to F-127), no pure compound was obtained from the this extract.

Characterization and identification of secondary metabolites

Melting points were determined using a Fisher Johns apparatus. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively, on a Varian 400 MHz-Premium Schelded equipment using tetramethylsilane as an internal reference. CDCl_3 and DMSO-d_6 were used as solvents; chemical shifts were expressed in parts per million (ppm) and coupling constants (J) were reported in (Hz). Mass spectra (MS) were determined by a gas chromatograph (Agilent Technologies 6890N) coupled to a mass spectrometer (Agilent Technologies 5973 inert).

Cell culture procedures

Four human cancer cell lines were used: PC-3 (prostate cancer), RKO (colon cancer), D-384 (astrocytoma), and MCF-7 (breast cancer). The cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 1% antibiotic-antimitotic solution (100 units/ml penicillin G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B, Gibco), and 1% L-glutamine (2 mM, Gibco). The cells were incubated at 37°C, 5% CO_2 . Viable cells were counted using the trypan blue exclusion method in a hemocytometer.

Cell viability analysis by MTS Assay

The MTS cell viability assay was used to assess the inhibitory effects of the extracts on the survival of human cancer cell lines. A total of $3\text{-}5 \times 10^3$ cells/well were seeded into 96-well plates and were allowed to adhere for 24 h. The cells were then treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of whole extract, at final volume of 2 ml. Each concentration/assay was performed three times. DMSO was used as a negative control at a final concentration of 0.1% v/v and 1 μM doxorubicin was used as a positive control. The cells were incubated with the treatments for 48 h, after which 20 μl MTS (5 mg/ml, Aqueous One Solution Reagent, GIBCO) was added and further incubated for 4 h at 37°C. The absorbance was measured at 570 nm. The data obtained with cells treated with DMSO were considered as 100% of viability.

Determination of Genotoxicity by Comet assay

Whole peripheral blood samples were obtained from three healthy male donors (age range 20-25 years). Heparinized blood samples (20 μ l) were cultured at 37°C in RPMI-1640 medium (1 ml, Gibco) supplemented with 1% L-glutamine (2 mM), and 1% non-essential amino acids (10 mM, Gibco), and were treated with three different concentrations of *Clusia latipes* Hex extract (25, 35, 50 μ g/ml). DMSO (0.5%) and ethyl methane sulfonate (EMS 0.1 μ M, Sigma chemical) were used as negative and positive controls, respectively. The cells were treated for 3 h at 37°C. Aliquots of 50 μ l of each sample were used to determine the percentage of viable cells using double staining with fluorescein diacetate-ethidium bromide (FDA/EtBr), counting a total of 200 cells (live-green, red-dead). A Comet assay was performed, as described by Sordo et al. (2001), with minor modifications. The treated cells were centrifuged and resuspended with 150 μ l low melting point agarose gel (LMPA, 1%). Then, 75 μ l of the mixture was placed in duplicate onto a slides previously covered with 150 μ l of agarose gel and immediately covered with a coverslip to make a microgel on the slide. Slides were placed in an ice-cold steel tray on ice for 1 min to allow the agarose to solidify. The coverslip was removed, and 75 μ l of LMP (1%) was layered as before. Slides were immersed in an ice-cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, and 10 mM Tris-base, pH 10). After lysis at 4°C for 1 h, slides were subjected to horizontal electrophoresis. The DNA was denatured for 20 min in electrophoresis running buffer solution (300 mM NaOH and 1 mM Na₂EDTA, pH>13.0). Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA (0.8 V/cm). All technical steps were conducted using very dim indirect light. After electrophoresis, the slides were gently removed and alkaline pH was neutralized with 0.4 M Tris, pH 7.5. The slides were dehydrated in two steps with absolute ethanol for 1 min each. Ethidium bromide (25 μ l of a 20 mg/ml solution) was added to each slide and a coverslip was placed on the gel. DNA migration was analyzed on a Zeiss Axioskop 2 plus microscope with fluorescence equipment (excitation filter 549 nm, barrier filter 590 nm), and the tail length was measured with a scaled ocular. For the evaluation of DNA migration, 100 cells were scored for each sample at 40x magnification.

Statistical analysis

All data are reported as mean \pm SEM of three independent experiments. The statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet post-test (GraphPad Prism 4). Comet data were analyzed using the Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison post-test (GraphPad Prism 4). $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Isolation of secondary metabolites from *C. latipes* leaves

Three extractions were conducted from the of *C. latipes* leaves: 1) Hex, 2) EtOAc and 3) MeOH, and four secondary metabolites were isolated and characterized. From the Hex extract, 108 fractions were obtained and three compounds were identified. From the fraction F-13 eluted with Hex:EtOAc (95:5), 36 mg of a white amorphous solid was isolated and identified as friedelin (**1**). From the fraction F-32 eluted with Hex:EtOAc (80:20), 22 mg of a solid was isolated and identified as friedolan 3-ol (**2**). From the fraction F-72 eluted with EtOAc:MeOH (80:20), 17 mg of yellow amorphous solid was isolated and identified as hesperidin (**3**). From the extract using EtOAc, 90 fractions were obtained. Only from fraction F-18, eluted with Hex:EtOAc (90:10), 8 mg of a solid was isolated and identified as β -amyrine (**4**). Any pure compound was obtained from the MeOH extract. All the compounds were identified based on physical and spectroscopic data, by comparison with the literature (Quintans et al., 2014; Subhadhirasakul and Pechongs, 2005; Almeida et al., 2011; Dias et al., 2011 and Aghel et al., 2008) (Scheme 1).

Characterization and identification of secondary metabolites

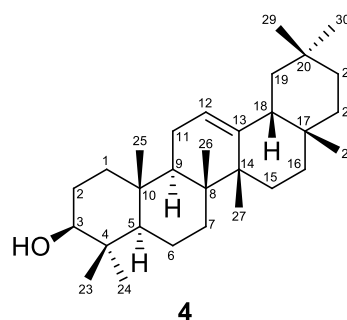
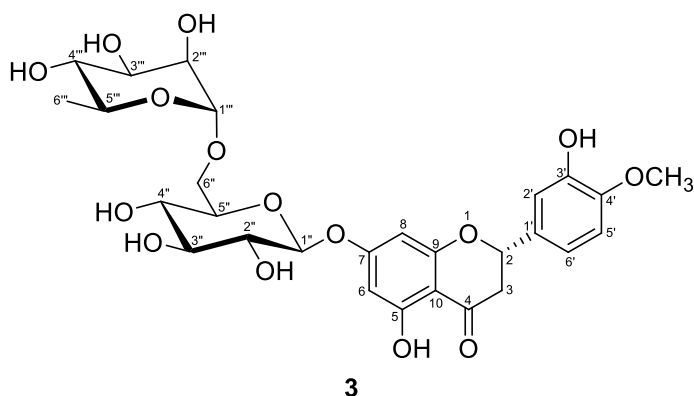
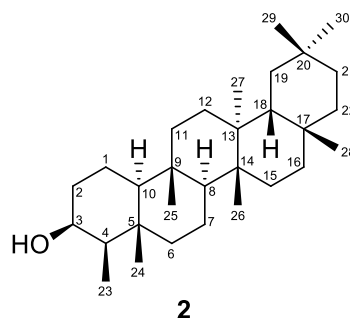
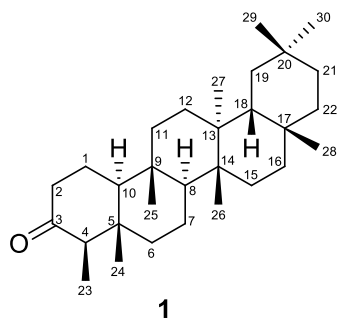
Physical and spectroscopic constants from friedelin (**1**): m.p. 235-239°C. EIMS m/z (%): 426 (M+, 38), 411 (12), 341 (7), 302 (16), 273 (31), 205 (27), 69 (100). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: 0.66 (s, 2H), 0.78 - 0.98 (m, 15H), 1.11 - 1.35 (m, 17H), 1.37 - 1.58 (m, 8H), 1.66 - 1.71 (m, 1H),

1.79 - 2.03 (m, 2H), 2.10 - 2.38 (m, 3H) 7.19 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ ppm: ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ ppm: 22.3 (C-1), 41.5 (C-2), 213.4 (C-3), 58.2 (C-4), 42.1 (C-5), 41.3 (C-6), 18.3 (C-7), 53.1 (C-8), 37.5 (C-9), 59.4 (C-10), 35.6 (C-11), 30.5 (C-12), 39.7 (C-13), 38.2 (C-14), 32.4 (C-15), 36.0 (C-16), 29.9 (C-17), 42.8 (C-18), 35.3 (C-19), 28.1 (C-20), 32.7 (C-21), 39.2 (C-22), 6.9 (C-23), 14.8 (C-24), 17.9 (C-25), 20.4 (C-26), 18.8 (C-27), 32.1 (C-28), 35.0 (C-29), 31.7 (C-30).

Physical and spectroscopic constants from friedolan 3-ol (**2**): m.p. 238- 241°C. EIMS *m/z* (%): 428 (M⁺, 20), 413 (27), 395 (7), 341 (3), 304 (2), 275 (23), 207 (11), 69 (100). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 3.72 (1H, bd, J = 3.1 Hz, H-3), 1.86 (1H, dt, J = 10.1, 3.0 Hz, H-2a), 1.70 (1H, dt, J = 12.8, 3.1 Hz, H-6a), 1.57 (1H, m, H-2b), 1.16 (3H, s, H-28), 0.99 (3H, s, H-29), 0.97 (6H, s, H-26 and H-27), 0.95 (3H, s, H-30), 0.94 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-23), 0.93 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-25). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ ppm: 15.8 (C-1), 35.1 (C-2), 72.3 (C-3), 49.2 (C-4), 37.1 (C-5), 41.7 (C-6), 17.9 (C-7), 53.3 (C-8), 37.8 (C-9), 60.2 (C-10), 35.2 (C-11), 30.6 (C-12), 39.4 (C-13), 39.8 (C-14), 32.9 (C-15), 36.1 (C-16), 30.0 (C-17), 42.9 (C-18), 36.2 (C-19), 28.3 (C-20), 32.1 (C-21), 39.3 (C-22), 11.6 (C-23), 16.4 (C-24), 18.2 (C-25), 18.8 (C-26), 20.1 (C-27), 32.3 (C-28), 35.0 (C-29), 31.9 (C-30).

Physical and spectroscopic constants from hesperidin (**3**): m.p. 258-259°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1.08 (3H, d, J = 6.0, H-6'''), 2.77 (1H, dd, J = 3.11, 15.11, H-3eq), 3.07 (1H, dd, J = 13.8, 12.0, H-3ax), 3.09-3.86 (2H, m, H-2''-H-5'''), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃), 4.52 (1H, d, J = 7.8, H-1''), 4.97 (1H, s, H-1'''), 5.49 (1H, dd, J = 3.11, 15.11, H-2), 6.12 (1H, sl, H-8), 6.15 (1H, sl, H-6), 6.92 (3H, m, H-2', H-5', H-6'), 12.06 (1H, s, 5-OH), ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 78.4 (C-2), 42.1 (C-3), 197.0 (C-4), 163.1 (C-5), 96.4 (C-6), 165.2 (C-7), 95.6 (C-8), 162.5 (C-9), 103.3 (C-10), 130.9 (C-1'), 114.2 (C-2'), 146.5 (C-3'), 147.9 (C-4'), 112.0 (C-5'), 117.9 (C-6'), 100.6 (C-1''), 73.0 (C-2''), 76.3 (C-3''), 69.6 (C-4''), 75.5 (C-5''), 66.1 (C-6''), 99.5 (C-1'''), 70.3 (C-2'''), 70.7 (C-3'''), 72.1 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 17.8 (C-6'''), 55.7 (4'-OCH₃).

Physical and spectroscopic constants from β -amyryne (**4**) m.p: 238- 241°C. EIMS m/z (%): 426 (M^+ , 51), 411 (20), 341 (10), 287 (13), 273 (61), 246 (33), 220 (18), 205 (57), 161 (29), 125 (85), 95 (100), 69 (97), 55 (56), 41 (30). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: 0.68 (1H, d, $J = 11.0$), 0.73 (1H, s), 0.77 (1H, s), 0.80 (1H, s), 0.87 (1H, s), 0.90 (1H, s), 0.93 (1H, s), 1.07 (1H, s), 1.19 (1H, s), 1.70 (1H, td, $J = 4.3, 13.5$ Hz), 1.8 (1H, m), 1.89 (1H, td, $J = 4.0, 14.0$ Hz), 1.93 (1H, dd, $J = 4.0, 13.7$ Hz), 3.15 (1H, dd, $J = 4.4, 10.8$ Hz, H-3), 5.12 (1H, t, $J = 3.2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ ppm: 38.7 (C-1), 27.2 (C-2), 79.3 (C-3), 38.5 (C-4), 55.1 (C-5), 18.6 (C-6), 32.4 (C-7), 39.8 (C-8), 47.6 (C-9), 36.9 (C-10), 23.6 (C-11), 121.7 (C-12), 145.2 (C-13), 41.7 (C-14), 26.2 (C-15), 26.1 (C-16), 32.6 (C-17), 47.2 (C-18), 46.8 (C-19), 31.0 (C-20), 34.6 (C-21), 37.2 (C-22), 28.1 (C-23), 15.3 (C-24), 15.3 (C-25), 16.7 (C-26), 25.7 (C-27), 28.5 (C-28), 33.8 (C-29), 23.7 (C-30).



Cytotoxic effect of whole extracts on human cancer cell lines

The effect of secondary metabolites on cell viability was determined by an MTS assay using human cancer cell lines treated for 48 h with whole extracts of *C. latipes* (50 $\mu\text{g/ml}$). Nearly all of the tested extracts inhibited the viability of the cancer cell lines by up to 25% (Table 1). However, the Hex extract was unable to inhibit the viability of the PC-3 prostate cancer cell line (1.8%), and the

MeOH extract showed a low inhibitory effect on MCF-7 cells (~9,5%), while it decreased the viability of the PC-3 prostate cancer cells by ~40%. The EtOAc extract was shown to be the most active in decreasing viability of all cancer cell lines (by more than 30%), and was more effective on the PC-3 prostate cancer cell line (~44%).

Genotoxic effect of Hex extract in human lymphocytes

In the present study, the Hex extract was selected to evaluate genotoxicity because it has molecules with protective potential, such as hesperidin (antitumor) and friedelin (anti-inflammatory) (Tanaka et al., 1997; Ahmadi et al., 2008; Hosseinimehr et al., 2009; Antonisamy et al., 2011; Sahu et al., 2013). Human lymphocytes were used for the experiment. We examined the possible cytotoxic and genotoxic effects of *Clusia latipes* Hex extract using double fluorescein diacetate/ethidium bromide staining (FDA/EtBr) and the Comet assay, respectively. The viability of the cells after exposure to the Hex extract (25, 35, and 50 µg/ml) was greater than 70% (Figure 1A), indicating that those doses were not cytotoxic. The positive control treated with EMS caused significant ($p < 0.001$). A clear and statistically significant increase in DNA migration was found in cells exposed to extracts compared ($p < 0.001$) tail length (Figure 1B). The genotoxic effects determined by the Comet assay displayed a dose-dependent response.

Discussion

The evaluation of toxicity or protective effects of various species used in traditional medicine is essential, and is increasingly receiving attention for their possible application in diseases such as cancer (Moreira et al., 2014). This study reports the chemical composition of various organic extracts obtained from *C. latipes* leaves and their *in vitro* antitumor activities (cytotoxic and genotoxic). The presence of beta-amyrin, friedelin and friedolan-3-ol is consistent with compounds commonly isolated from other species of the same genus (Reyes-Chilpa et al., 2004; Teixeira et al., 2006; Mangas Marín et al., 2008; Ribeiro et al., 2011). However, in the present study, we

successfully isolated and identified the presence of hesperidin in *C. latipes*, which represents the first report of this molecule from the genus *Clusia*. The presence of hesperidin may justify the use of *C. latipes* in traditional medicine and skin care, because this flavone has been shown to inhibit lesions of atopic dermatitis and the elevation of IgE in plasma of NC/Nga mice (Nagashio et al., 2013), as well as to stimulate epidermal proliferation in normal mouse skin (Hou et al., 2012). However, hesperidin also has anti-proliferative effects in tumor cells, including breast cancer (Natarajan et al., 2011) and colon cancer (Park et al., 2008). In addition, the hesperidin displayed cytotoxic effects on cell lines that show drug resistance, which was related to the ABC transporter function (Bailón-Moscoso et al., 2014). In the present study, the observed anti-proliferative effect of the extracts on selected cancer cells could be attributed to the presence of hesperidin, as well as the two triterpenes isolated, friedelin (**1**) and friedolan-3-ol (**2**). In similar studies, it has been observed that both friedelin and friedolan-3-ol have cytotoxic activity in other cell lines (Hela and CEM-SS), with IC₅₀ values between 3.5 µg/ml and 11.8 µg/ml (Utami et al., 2013).

Contrary to expectations, the *Clusia latipes* Hex extract induced a significant increase ($p < 0.001$) in DNA damage in lymphocytes exposed to the concentrations used in this study. Because the potential chemical or metabolic interactions of the phytometabolites from the extracts with the oxidative cell machinery may produce reactive oxygen species, we suggest that the tested phytometabolites could lead to the formation of free radicals. These free radicals are capable of inducing DNA strand breaks, which were detected by the Comet assay. The damage detected by this method is repairable DNA damage; thus, it is necessary to perform other experiments to determine the genotoxic effects.

Further studies are needed to corroborate the cytotoxic and genotoxic effects of this mixture and to provide a molecular mechanistic foundation of these effects prior to any potential antineoplastic use.

Authors' contributions

NBM (PhD student) contributed by collecting plant samples, conducting the laboratory work, analyzing the data and drafting the paper. MS, JV and LC contributed to the biological studies. JCRB and RS contributed by obtaining extracts and isolating and characterizing secondary metabolites. MMV contributed by critical reading of the manuscript. POW designed the study, supervised the laboratory work and contributed to critical reading of the manuscript. All of the authors read the final manuscript and approved the submission.

Conflict of interest

All authors have none to declare.

Acknowledgments

We appreciate the identification of plant material and the technical support provided by Dr. Vladimir Morocho. We thank Dr. Edward Ratovitski (PROMETEO-SENESCYT-Ecuador) for continuous support and invaluable advice during preparation of the manuscript. N.B.M. acknowledges the fellowship awarded by SENESCYT to carry out her PhD studies in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This article was part of the doctoral thesis of N.B.M.

References

- Aghel, N., Ramezani, Z., Beiranvand, S., 2008. Hesperidin from *Citrus sinensis* cultivated in Dezful, Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 11, 2451–2453.
- Ahmadi, A., Hosseinimehr, S.J., Naghshvar, F., Hajir, E., Ghahremani, M., 2008. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Arch. Pharm. Res.* 31, 794–7.
- Antonisamy, P., Duraipandiyar, V., Ignacimuthu, S., 2011. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1070–1077.
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J.C., Ostrosky-Wegman, P., 2014. Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumour Biol.* 35, 3981–3995.

- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431–41.
- Díaz-Carballo, D., Gustmann, S., Acikelli, A.H., Bardenheuer, W., Buehler, H., Jastrow, H., Ergun, S., Strumberg, D., 2012. 7-epi-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells. *Phytomedicine* 19, 1298–306.
- Ferreira, R.O., Junior, A.R. de C., da Silva, T.M.G., Castro, R.N., da Silva, T.M.S., de Carvalho, M.G., 2014. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 617–625.
- Gao, X., Wang, W., Wei, S., Li, W., 2009. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 34, 2695–2700.
- Hemshekhar, M., Sunitha, K., Santhosh, M.S., S.Devaraja, S., Kemparaju, K., Vishwanath, B.S., Niranjana, S.R., Girish, K., 2011. An overview on genus garcinia: phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochem. Rev.* 10, 325–351.
- Hosseinimehr, S.J., Ahmadi, A., Beiki, D., Habibi, E., Mahmoudzadeh, A., 2009. Protective effects of hesperidin against genotoxicity induced by (99m)Tc-MIBI in human cultured lymphocyte cells. *Nucl. Med. Biol.* 36, 863–7.
- Hou, M., Man, M., Man, W., Zhu, W., Hupe, M., Park, K., Crumrine, D., Elias, P.M., Man, M.Q., 2012. Topical hesperidin improves epidermal permeability barrier function and epidermal differentiation in normal murine skin. *Exp. Dermatol.* 21, 337–340.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M.D.C., Lozada, L., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R., 2004. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 916–20.
- Mangas Marín, R., Montes de Oca Porto, R., Bello Alarcón, A., Nival Vázquez, A., 2008. Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm.* 27, 747–751.
- Monks, N.R., Bordignon, S. a. L., Ferraz, A., Machado, K.R., Faria, D.H., Lopes, R.M., Mondin, C., Souza, I., Lima, M.F.S., da Rocha, A.B., Schwartsmann, G., 2002. Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. *Pharm. Biol.* 40, 603–616.
- Moreira, D.D.L., Teixeira, S.S., Monteiro, M.H.D., De-Oliveira, A.C. a X., Paumgartten, F.J.R., 2014. Traditional use and safety of herbal medicines. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 248–257.
- Nagashio, Y., Matsuura, Y., Miyamoto, J., Kometani, T., Suzuki, T., Tanabe, S., 2013. Hesperidin inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by suppressing Th17 activity. *J. Funct. Foods* 5, 1633–1641.
- Natarajan, N., Thamaraiselvan, R., Lingaiah, H., Srinivasan, P., Maruthaiveeran Periyasamy, B., 2011. Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Biomed. Prev. Nutr.* 1, 207–215.
- Park, H.J., Kim, M.-J., Ha, E., Chung, J.-H., 2008. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine* 15, 147–51.

- Quintans, J.S.S., Costa, E. V., Tavares, J.F., Souza, T.T., Araújo, S.S., Estevam, C.S., Barison, A., Cabral, A.G.S., Silva, M., Serafini, M., Quintans-Júnior, L., 2014. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarceanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 60–66.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Apan, T.R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C.K., Vázquez-Torres, M., 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci.* 75, 1635–47.
- Ribeiro, P.R., Ferraz, C.G., Guedes, M.L.S., Martins, D., Cruz, F.G., 2011. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. *Fitoterapia* 82, 1237–40.
- Sahu, B.D., Kuncha, M., Sindhura, G.J., Sistla, R., 2013. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. *Phytomedicine* 20, 453–60.
- Stevens, P., 2007. Clusiaceae-Guttiferae. *Flower. Plants· Eudicots* 255.
- Suffredini, I.B., Paciencia, M.L., Nepomuceno, D.C., Younes, R.N., Varella, A.D., 2006. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts-Clusiaceae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 287–90.
- Sordo, M., Herrera, L. A., Ostrosky-Wegman, P., Rojas, E., 2001. Cytotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21, 249–60.
- Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, a, Sumida, T., Ogawa, H., 1997. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis* 18, 957–65.
- Teixeira, J., Moreira, L., da S. Guedes, M., Cruz, F., 2006. A new biphenyl from *Clusia melchiorii* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 812–815.
- Utami, R., Khalid, N., Sukari, M.A., Rahmani, M., Abdul, A.B., Dachriyanus, 2013. Phenolic contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Elaeocarpus floribundus* Blume. *Pak. J. Pharm. Sci.* 26, 245–50.
- Valadeau, C., Castillo, J.A., Sauvain, M., Lores, A.F., Bourdy, G., 2010. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *J. Ethnopharmacol.* 127, 175–192.

Scheme 1. Secondary metabolites isolated from the hexane and ethyl acetate extracts of *Clusia latipes*.

Figure 1. Cytotoxicity and genotoxicity effects of *Clusia latipes* Hex extract on human lymphocytes

exposed to 25, 35, and 50 $\mu\text{g/ml}$. A) Cell viability determined by FDA/EtBr. B) DNA damage determined by Comet assay. EMS was used as a positive control. *** $p < 0.0001$ with respect to control group (Kruskal-Wallis and Dunn's tests).