

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DEL COMPUESTO  
NATURAL PENTAGALOILGLUCOSA**

**YULIETH XIMENA TORRES LLANOS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2011**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DEL COMPUESTO  
NATURAL PENTAGALOILGLUCOSA**

**YULIETH XIMENA TORRES LLANOS**

---

**Dra. Ingrid Schuler**  
**Decana Académica**  
**Facultad de Ciencias**

---

**Dra. Diana Patiño**  
**Directora Carrera de Bacteriología**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DEL COMPUESTO  
NATURAL PENTAGALOILGLUCOSA**

**YULIETH XIMENA TORRES LLANOS**

---

Dr John Hernández  
**Director**

---

Dr Alfonso Barreto  
**Jurado**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

## CONTENIDO

	<b>Pag</b>
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
1. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMAS .....	8
2. MARCO TEÓRICO .....	9
2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER .....	9
2.1.1 Quimioterapia en el Tratamiento Contra el Cáncer .....	9
2.1.2 Efectos Adversos de la Quimioterapia .....	13
2.2 ANTECEDENTES DEL USO DE PLANTAS MEDICINALES COMO TRATAMIENTO NATURAL CONTRA EL CÁNCER .....	14
2.2.1 Estructura Química y Actividad Biológica de los Polifenoles .....	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: LA PENTAGALOILGLUCOSA -PGG- .....	16
3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y FUENTES NATURALES DE OBTENCIÓN .....	16
3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PGG .....	17
3.2.1 Actividad Citotóxica <i>in vitro</i> .....	17
3.2.1.1 Apoptosis.....	17
3.2.1.2 Arresto del Ciclo Celular .....	18
3.2.1.3 Autofagia .....	21
3.3 INHIBICIÓN DE BOMBAS DE RESISTENCIA.....	22
3.4 ACTIVIDAD ANTIMETASTÁSICA.....	22
3.5 ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA .....	23

3.6 ACTIVIDAD ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i> SOBRE EL TUMOR PRIMARIO .....	25
3.7 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y SU IMPORTANCIA EN CÁNCER.....	26
3.8 CO-TRATAMIENTO .....	26
3.9 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN ANIMALES .....	27
4. CONCLUSIONES .....	28
5. BIBLIOGRAFÍA .....	30

## RESUMEN

La búsqueda científica de medicamentos contra el cáncer ha adquirido gran importancia en los últimos años a nivel mundial, su importancia radica en los altos índices de mortalidad a consecuencia del desarrollo de esta patología y la baja respuesta y/o adherencia que tienen los pacientes a los fármacos antineoplásicos. La posibilidad de incluir como quimioterapia compuestos naturales con actividad antitumoral, resulta ser un objetivo encaminado al logro de la implementación de nuevos quimioterapéuticos capaces de contrarrestar la proliferación, metástasis y crecimiento de células tumorales, que así mismo disminuyan los efectos deletéreos generados por la citotoxicidad de la mayoría de los medicamentos utilizados en los esquemas farmacológicos contra el cáncer. Algunos compuestos extraídos de plantas medicinales, como la epigalocatequina (EGCG), el resveratrol, la quercetina, la curcumina, la teaflavina, entre otros, han demostrado diferentes actividades biológicas que afectan de forma directa a las células tumorales [1]

Entre estos compuestos naturales se encuentra la Pentagalloylglucosa (PGG). Un polifenol con un centro de glucosa esterificado por 5 ácidos gálicos. Se encuentra ampliamente distribuido en plantas medicinales como: *Rhus chinensis*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Terminalia chebula* y *Caesalpinia spinosa* entre otras. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, demuestran efectos citotóxicos, antimetástasicos, antiangiogénicos, antiproliferativos, antiinflamatorios y antitumorales, en líneas celulares de cáncer de próstata, cáncer de seno, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, sarcoma, melanoma y leucemia, y en modelos animales xenoinjertados con algunos de estos tipos de cáncer [2] [3, 4]. Adicionalmente, se ha llevado a cabo un estudio que define los parámetros básicos de la farmacocinética, el protocolo de detección del compuesto en plasma de ratón y el método de obtención de PGG por metanólisis del ácido tánico[5].

Debido a la actividad antitumoral evidenciada en varios reportes a nivel mundial, se expone este compuesto como un posible quimioterapéutico contra el cáncer. El desarrollo de esta revisión bibliográfica tiene por objetivo principal describir y analizar la actividad biológica y los mecanismos de acción reportados en la literatura científica para el compuesto PGG, con el fin de evaluar su posible uso en la terapia contra el cáncer; para el cumplimiento de dicho objetivo, se identificaran: los mecanismos de acción relacionados con la actividad citotóxica y antitumoral, la viabilidad de la aplicación del compuesto como alternativa quimioterapéutica contra el cáncer con base en lo reportado en la literatura y se establecerá un perfil de seguridad del compuesto PGG.

La metodología de esta revisión se desarrolla a partir de la búsqueda en las bases de datos: Pubmed, ScienceDirect, Ebrary, Scopus y Pubchem, utilizando los siguientes criterios de búsqueda: pentagalloylglucose, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose, antitumoral, cáncer, malignant neoplastic disease, metastatic, neoplastic cells, gallotannins, PGG, antiinflammatory, toxicity.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente las investigaciones contra el cáncer son orientadas a la búsqueda de tratamientos efectivos que a su vez no generen efectos secundarios en el paciente. En esta búsqueda, han ido creciendo en popularidad los compuestos naturales obtenidos de plantas usadas en la medicina tradicional, principalmente, los polifenoles presentes en diferentes clases de té y ciertas plantas medicinales, los cuales han demostrado actividad antitumoral, antiinflamatoria, antimetastásica y antioxidante [6].

Uno de estos polifenoles es la PGG extraída de diferentes plantas como: *Rhus chinensis*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Terminalia chebula* y *Caesalpinia spinosa* entre otras, que también puede ser obtenida por metanólisis del ácido tánico. Se considera la unidad estructural de los taninos hidrolizables y su estructura química consta de un esqueleto de glucosa esterificado con 5 ácidos gálicos [7] [5].

La actividad biológica de este compuesto es diversa, varios estudios han demostrado actividad citotóxica, antitumoral, antimetastásica y antiinflamatoria [2], estos efectos han sido evidenciados en experimentos *in vitro* e *in vivo* y las observaciones sugieren que los efectos de la PGG son incluso más potentes que los derivados del té como la EGCG epigallocatequina [1]. Su actividad biológica ha sido probada en diferentes líneas celulares de cáncer humano entre las cuales están: próstata, seno, pulmón, hígado, leucemia y melanoma, también ha sido evaluada en modelos animales. Los resultados de los ensayos sugieren que la PGG induce arresto en el ciclo celular, apoptosis o autofagia, inhibe la metástasis, la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias y actúa en sinergia con fármacos quimioterapéuticos. Aunque la PGG no ha sido evaluada en humanos, hasta el momento se postula como un buen candidato para el inicio de estudios clínicos que busquen evaluar su potencial en el tratamiento contra el cáncer.

### 1. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PGG es un polifenól presente en varias plantas como *Rhus chinensis*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Terminalia chebula* y *Caesalpinia spinosa*, entre otras, y se puede obtener por metanólisis del ácido tánico y separación utilizando cromatografía líquida [7],[8]. En los últimos años, este compuesto ha sido objeto de estudio de varios grupos de investigación y ha mostrado actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de próstata, cáncer de seno y cáncer de hígado, principalmente [3, 9, 10].

El PGG genera interés por ser derivado de plantas medicinales [2], postulándose como una alternativa terapéutica de origen natural, que podría tener menos efectos secundarios o incluso disminuir los generados por las terapias actualmente utilizadas. Aun cuando los estudios realizados hasta el momento se han limitado a ensayos *in vitro* e *in vivo* en

animales de experimentación, la actividad antitumoral del PGG ha sido claramente evidenciada, por lo que este compuesto de origen natural puede ser un futuro candidato para la realización de estudios clínicos en humanos.

Sin embargo, no existe suficiente información acerca de las propiedades biológicas del compuesto y las revisiones que se han realizado resultan estar desactualizadas y no poseen información detallada de las aplicaciones terapéuticas en cáncer [2]. Tras los recientes estudios con el PGG, podría considerarse un posible uso de este compuesto como terapia natural contra el cáncer, y la presente revisión reunirá los datos más importantes para los investigadores, lo cual soportará los futuros ensayos del compuesto, contribuyendo con el conocimiento y fortalecimiento del tema.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER**

El cáncer es una patología que involucra la proliferación y crecimiento celular anormal, puede ser generado por múltiples eventos a nivel celular que involucran fallas a nivel transcripcional, en la síntesis o reparación de DNA, en la regulación de los genes que controlan el crecimiento y/o muerte celular; a partir de estos defectos las células adquieren un fenotipo y genotipo específico que contribuye a la identificación, clasificación, pronóstico y terapia del cáncer [11].

El desequilibrio de estos procesos celulares le confiere a las células tumorales características de inmortalidad, autonomía e independencia y la capacidad de invadir otros tejidos u órganos, provocando la migración de las células hacia un ambiente de competencia con las células normales por espacio y nutrientes, perjudicando los procesos fisiológicos y bioquímicos necesarios para el crecimiento y desarrollo de las células normales y creando un desequilibrio entre el total de células de cada población, evento que finalmente favorecerá el incremento de las células tumorales. Sin embargo, algunos procesos también involucran una proliferación desordenada de las células, sin que esto conlleve al desarrollo de cáncer en el paciente; la afección que se genera es consecuencia del efecto de masa dado por el crecimiento celular en determinado sitio anatómico que genera presión local y por consiguiente defectos en la función del órgano o tejido diana [12].

#### **2.1.1 Quimioterapia En El Tratamiento Contra El Cáncer**

El término quimioterapia hace referencia a cualquier tratamiento que involucre el uso de medicamentos capaces de erradicar una enfermedad. En cáncer, la elección de estos fármacos depende del tipo y localización del tumor, de los marcadores moleculares

presentes en las células tumorales, de la resistencia natural a los compuestos, entre otros factores. El tratamiento efectivo contra el cáncer, muchas veces debe estar acompañado de agentes quimioterapéuticos capaces de eliminar todas las células tumorales, que a su vez estimulen la respuesta inmune, para que sea este el encargado de controlar las células tumorales residuales que no son eliminadas por completo por la acción de los fármacos [13].

El objetivo de la quimioterapia es inducir la muerte de las células tumorales y evitar la metástasis a otros sitios, se han identificado principalmente tres formas de muerte celular, una es la apoptosis donde ocurre una condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, involución de la membrana plasmática y finalmente desintegración total de la célula. Algunas células tumorales pueden morir por necrosis, en donde hay una ruptura de la membrana plasmática provocando la liberación de los organelos y todo el contenido celular hacia el espacio extracelular. Otra forma de muerte es la autofagia, en esta modalidad ocurre un secuestro de grandes cantidades de citoplasma que son encerrados en vacuolas de la misma célula, esto ocurre antes de que la célula entre en apoptosis [14].

Los fármacos quimioterapéuticos pueden actuar de diferentes maneras:

- Afectando la síntesis y replicación del DNA
- Alterando la transcripción y traducción del RNA
- Interrumpiendo el ciclo celular
- Bloqueando vías de señalización involucradas en el crecimiento celular.

Los eventos que se desencadenan luego de la acción del fármaco conllevan a la activación de mecanismos de reparación del DNA o incremento de la apoptosis. Aunque se conocen los efectos biológicos de los quimioterapéuticos, la mayoría son poco específicos y su efecto es relativo dependiendo de la clase de tumor.

Una de las variables importantes en la quimioterapia contra el cáncer, es la resistencia que hace el paciente a los quimioterapéuticos. Diferentes variables pueden afectar el éxito del tratamiento [13]:

- **Metabolismo del fármaco:** se debe tener en cuenta la absorción, distribución y metabolismo del medicamento. Adicionalmente, la función puede verse afectada si el paciente presenta ciertos tipos de mutaciones que impidan la conversión del fármaco a su forma activa o lo degraden antes que genere el efecto. Estos defectos hacen que el medicamento no logre alcanzar la concentración plasmática adecuada para hacer ser eficaz contra el tumor.
- **Resistencia intrínseca:** debido a la inestabilidad genética que se presenta en esta enfermedad, la función de las enzimas y proteínas transportadoras se ve afectada. Algunas células tumorales son capaces de reparar el daño causado por los agentes

citotóxicos antes de la división celular, también pueden incrementar la expulsión del fármaco mediante las bombas de resistencia o implementar nuevas rutas bioquímicas para continuar su crecimiento.

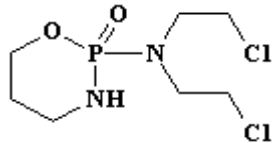
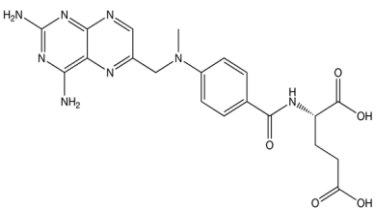
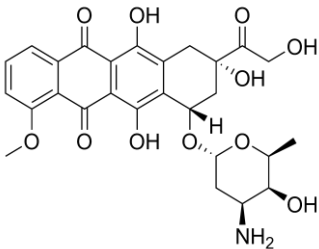
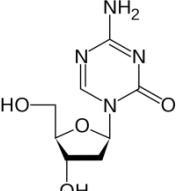
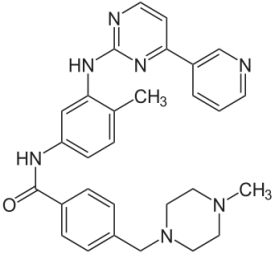
### **Mecanismos de acción de los quimioterapéuticos**

Existen diferentes clases de quimioterapéuticos para el tratamiento contra el cáncer. Generalmente se elige una terapia combinada la cual incluye diferentes tipos y dosis de fármacos, esto puede variar de una persona a otra, pero el objetivo principal es disminuir la aparición de efectos secundarios en el paciente y la resistencia por parte de las células tumorales (Tabla 1) [14]. Los quimioterapéuticos se pueden clasificar de la siguiente forma:

- a) **Agentes alquilantes:** Alteran la replicación del DNA y promueven la muerte celular formando enlaces covalentes o puentes cruzados entre los grupos alquilo y los ácidos nucleicos o también pueden mediar uniones incorrectas entre bases nitrogenadas.
- b) **Anti-metabolitos:** Interfieren en la biosíntesis de RNA y DNA actuando como análogos del ácido fólico, purinas y pirimidinas, creando sustituciones falsas o inhibición de enzimas necesarias para la síntesis de DNA y RNA
- c) **Antibióticos antitumorales:** Derivados de cultivos bacterianos y fúngicos, que interfieren en la biosíntesis de DNA intercalándose entre las bases nitrogenadas y favoreciendo la formación de radicales libres de oxígeno dependientes de hierro los cuales también tienen efecto deletéreo sobre el DNA y las membranas celulares.
- d) **Inhibidores de la DNA metiltransferasa:** La 2'-deoxi-5-azacitidina actúa como análogo de la citidina, causa demetilación en el DNA dando como resultado la activación de genes silenciados, entre ellos genes supresores de tumor.
- e) **Inhibidores de tirosin cinasa:** Bloquean el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGF) y la activación de la tirosin cinasa, esto permite el bloqueo de vías de señalización que intervienen en la división celular
- f) **Agentes antiangiogénicos:** Se unen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) previniendo la interacción con los receptores endoteliales en las células, causando un daño en la vasculatura tumoral e inhibiendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos
- g) **Bloqueadores de marcadores de diferenciación (CD):** Son anticuerpos específicos contra los CD de las células tumorales capaces de interrumpir las vías de señalización

intracelular necesarias para la diferenciación y crecimiento, actúan induciendo apoptosis

Hoy en día se llevan a cabo otras investigaciones orientadas al desarrollo de nuevos fármacos para combatir la resistencia de las células tumorales, entre ellos están: inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), inhibidores de metaloproteinasas e inhibidores de proteína cinasa C (PKC) [13].

FÁRMACO	TIPO	ESTRUCTURA	USO
<b>Ciclofosfamida</b>	Agente alquilante		Linfomas Leucemias Cáncer de seno
<b>Metotrexato</b>	Antimetabolito (Antagonista Ac. Fólico)		Leucemia linfoblástica aguda. Linfoma No-Hodgkin Cáncer de seno Osteosarcoma
<b>Doxorrubicina</b>	Antibiótico antitumoral		Linfoma Hodgkin, Mieloma múltiple, cáncer de vejiga, seno, estómago, pulmón, ovarios y tiroides.
<b>Decitabina</b>	Inhibidor de la DNA metiltransferasa		Leucemia Mielomonocítica Crónica
<b>Imatinib</b>	Inhibidor de tirosina cinasa		Leucemia Mieloide Crónica
<b>Bevacizumab</b>	Antiangiogenico	Anticuerpo Monoclonal dirigido	Cáncer de colon,

		contra VEGF	seno y pulmón.
<b>Rituximab</b>	Bloqueador de CD	Anticuerpo Monoclonal quimérico dirigido contra CD20	Linfoma no-Hodgkin

**Tabla 1.** Ejemplos de quimioterapéuticos utilizados contra diferentes tipos de cáncer, ordenados según su mecanismo de acción y estructura química.

### 2.1.2 EFECTOS ADVERSOS DE LA QUIMIOTERAPIA

Los quimioterapéuticos tienen poca especificidad frente al cáncer, es decir, afectan tanto a las células tumorales como a las células normales. Uno de los mayores problemas de los antineoplásicos es provocar efectos secundarios con mayor frecuencia y severidad que los medicamentos comunes, por esta razón, se hace necesario el constante monitoreo de los pacientes sometidos a quimioterapia con el fin de detectar las reacciones adversas que puedan comprometer la vida de la persona.

La toxicidad del medicamento puede variar dependiendo de varios factores como el tipo de fármaco, la dosis, la vía de administración o factores del paciente que pueden predisponerlo a padecerla. Aunque todos los medicamentos son sometidos a rigurosas pruebas clínicas para evaluar su efecto en los humanos, hay eventos que se mantienen constantes en los antineoplásicos. Se ha observado que los efectos secundarios afectan principalmente a las células normales que presentan mayor tasa de recambio o velocidad de división, por ejemplo, la médula ósea y las células de los epitelios del tracto gastrointestinal y folículos pilosos [15].

La liberación repentina y sistémica de células tumorales muertas, puede llegar a desarrollar consecuencias perjudiciales para el paciente. Algunos tratamientos locales para ciertos tipos de cáncer logran ser efectivos durante cierto tiempo, sin embargo, se ha observado la liberación de citocinas proinflamatorias, expresión de moléculas activadoras del endotelio y reclutamiento de linfocitos, granulocitos y macrófagos al sitio de lesión, este tipo de activación no es una respuesta inmune eficiente, por el contrario, este ambiente generado por las células tumorales o por las células normales del huésped favorece la permanencia del tumor tras la activación de vías de señalización vía NF-κB [14].

Los eventos agudos que se presentan con mayor frecuencia tras la administración de los quimioterapéuticos son: náuseas, vómitos, alopecia y ulceración de las mucosas. También se pueden observar eventos adversos tardíos como: toxicidad cardíaca, pulmonar y renal, neurotoxicidad, mielod depresión (aguda y tardía), menopausia prematura, entre otros [15].

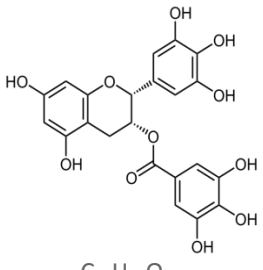
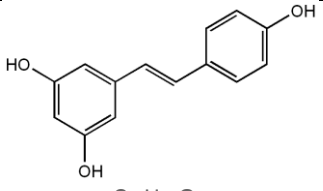
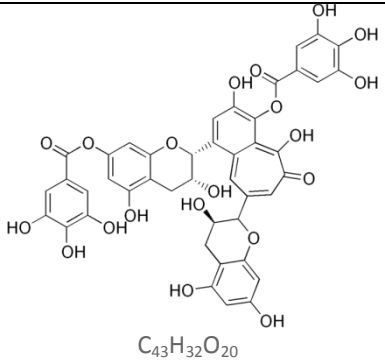
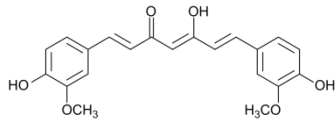
## **2.2 ANTECEDENTES DEL USO DE PLANTAS MEDICINALES COMO TRATAMIENTO NATURAL CONTRA EL CÁNCER**

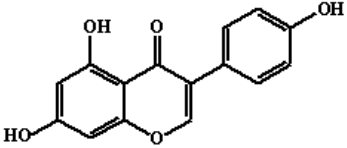
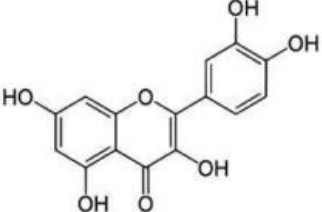
A lo largo de la historia, las plantas han sido utilizadas por la humanidad para el tratamiento de diferentes enfermedades. Las plantas medicinales y sus derivados han demostrado diferentes usos y acciones, entre los cuales se pueden mencionar: tratamiento contra la malaria (quinina), acción analgésica (morfina, aspirina) y antioxidante (resveratrol), entre otras. Son estos antecedentes principalmente los que conllevaron al avance en el campo de la investigación de productos naturales contra el cáncer, entre los fármacos descubiertos se encuentran la vinblastina y vincristina, el progreso de las investigaciones con compuestos de origen natural fue abalado en el año 1950 por el *National Cancer Institute* (NCI) [16].

### **2.2.1 Estructura Química Y Actividad Biológica De Los Polifenóles**

Los polifenóles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, han sido ampliamente investigados por exhibir actividad biológica antitumoral y antioxidativa y se pueden encontrar en distintas clases de té, como el té verde y el té negro (*Camellia sinensis*), frutas cítricas como la uva, algunos cereales como la soya y vegetales como el brócoli, cebolla, pimientos, entre otros [6]. En las plantas estos compuestos contribuyen a la resistencia a microorganismos patógenos, insectos y herbívoros, protegen contra la radiación solar, intervienen en la nutrición, crecimiento y reproducción [17].

En la naturaleza existen varias clases de polifenoles. Las proantocianidinas son taninos condensados como las procianidinas, prodelfinidinas y profisetinidinas; los galo y elagitaninos son taninos hidrolizables derivados del ácido gálico, los cuales por medio de reacciones de esterificación y oxidación dan como resultado numerosos compuestos entre ellos los polioles con un anillo central de azúcar; y los florotaninos que se encuentran en las algas rojas. Sin embargo, existen otros grupos de polifenoles menos complejos como la EGCG, epicatequina galato, teaflavina, curcumina, quercitina, flavonoides, resveratrol, entre otros [17].

COMPUESTO	ESTRUCTURA/FUENTE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
<b>EGCG</b>	 <p><math>C_{22}H_{18}O_{11}</math></p> <p><b>Te verde</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la actividad del proteasoma [6].</li> <li>• Inhibe el crecimiento de las células de cáncer de cuello uterino [18].</li> <li>• Reduce la expresión del VEGF [19].</li> <li>• Disminuye la expresión del IL-1R y suprime la IL-1 inducida por factores tumorigénicos [20].</li> <li>• Inhibición del proteasoma, inhibición de la metilación del DNA y efectos antioxidativos [6].</li> <li>• Disminuye el tamaño y el número de tumores de piel y duodenales en ratones [7].</li> </ul>
<b>Resveratrol</b>	 <p><math>C_{14}H_{12}O_3</math></p> <p><b>Uvas</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suprime la activación de AKT, inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno e induce la apoptosis [21].</li> <li>• Suprime el crecimiento de células tumorales de piel, a través de la inhibición de la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos y p53 [22].</li> <li>• Altera la expresión de microRNA en cáncer de pulmón [23].</li> </ul>
<b>Teaflavina digalato</b>	 <p><math>C_{43}H_{32}O_{20}</math></p> <p><b>Te verde</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuye la regulación del factor de crecimiento epidermal [24].</li> <li>• Inhibe la expresión del receptor de andrógenos en líneas de CaP LNCaP [25].</li> </ul>
<b>Curcumina</b>	 <p><b>Curcuma</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la proliferación y favorece la apoptosis en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [26].</li> <li>• Inhibe la angiogénesis en ratones <i>nude</i> xenoinjertados con hepatocarcinoma HepG2 debido a la disminución en la expresión de la COX-2 y el VEGF [27].</li> </ul>

<p><b>Genisteina</b></p>	 <p>Soya</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exhibe actividad antitumoral y antiproliferativa en modelos de ratón con de próstata [28].</li> <li>• Inhibe hasta el 50% de la proliferación celular en la línea cáncer de seno MDA-MB-231 (20 mcmmol/L) [29].</li> </ul>
<p><b>Quercetina</b></p>	 <p>Cebolla</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la actividad del proteasoma e induce apoptosis en células Jurkat [30].</li> <li>• Inhibe la melanogénesis en melanoma [31]</li> </ul>

**Tabla 2.** Ejemplo de polifenoles y su actividad biológica frente a diferentes líneas tumorales y en modelos animales. Se observa la estructura y fuentes principales de obtención natural

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### LA PENTAGALOILGLUCOSA PGG

##### 3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y FUENTES NATURALES DE OBTENCIÓN

La PGG es un galotanino hidrolizable compuesto por una molécula de glucosa con 5 grupos hidroxilo esterificados con 5 moléculas de ácido gálico (Fig 1), se pueden encontrar dos tipos de configuraciones, la  $\beta$ -PGG que es la forma prevalente en las extracciones, sin embargo, en ocasiones se puede aislar en la configuración  $\alpha$ -PGG. Este compuesto se encuentra en diferentes plantas como: *Rhus chinensis*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Schinus terebinthifolius*, *Acer truncatum*, *Terminalia chebula* y *Caesalpinia spinosa*; [2, 5, 7].

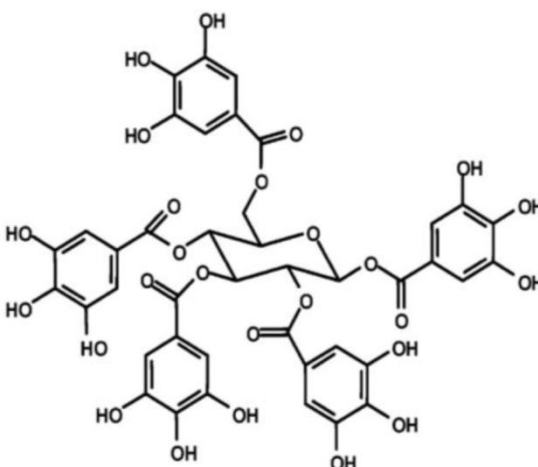


Fig 1. Estructura química de 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloil- $\beta$ -D-glucosa ( $\beta$ -PGG)

La concentración de PGG en su forma libre es variable en cada especie (por ejemplo en *Rhus chinensis* se encuentra entre el 50 y 70% de galotaninos [32]), para su obtención en el laboratorio se ha utilizado la metanólisis del ácido tánico, un precursor más abundante en la naturaleza, a partir del cual se puede obtener PGG con un 99% de pureza [5].

## 3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PGG

### 3.2.1 Actividad Citotóxica *In Vitro*

La muerte celular puede desencadenarse de varias formas, entre ellas: apoptosis, autofagia y necrosis, principalmente. También puede ser desencadenada indirectamente en algunos tipos de tumor después de un arresto en el ciclo celular [14]. La PGG en experimentos *in vitro* induce la muerte celular en líneas de cáncer de pulmón (LLC IC<sub>50</sub>: 75  $\mu$ M), cáncer de próstata (TRAMP IC<sub>50</sub>: 25  $\mu$ M), cáncer de hígado (SK-HEP-1 IC<sub>50</sub>: 30  $\mu$ M) y leucemia (HL-60 IC<sub>50</sub>: 15  $\mu$ M) [4, 33-36]

#### 3.2.1.1 Apoptosis

En la línea celular HL-60 de leucemia humana promielocítica, un ensayo de 24h utilizando una concentración de 50  $\mu$ M de PGG reduce la viabilidad celular, fragmenta el DNA, produce cambios morfológicos celulares, condensa la cromatina, incrementa la actividad de la caspasa-3, disminuye el potencial de la membrana mitocondrial aumentando la liberación de citocromo c en el citosol y aumenta el clivaje de pro-caspasa-9 [36].

En la línea de cáncer de próstata DU145 un tratamiento de 4 días con 50 y 70  $\mu$ M de PGG induce muerte celular mediada por caspasas, incrementando los niveles de PARP, caspasa-9 y caspasa-3. En TRAMP, el tratamiento con 25  $\mu$ M de PGG durante 24h inhibe el

crecimiento celular con aumento de PARP [34]. Estos resultados concuerdan con los hallazgos reportados por Hongbo, Jeong y colaboradores, quienes señalan que el bloqueo de STAT3 favorece la apoptosis mediada por caspasas [33] [35].

Los compuestos pueden ejercer actividad citotóxica o citostática. Es importante diferenciar estos dos efectos, la actividad citotóxica sobre las células en división se evidencia por la disminución del conteo celular por debajo del número de células en el inicio del ensayo o tiempo cero, mientras que la actividad citostática se observa durante el crecimiento celular, en general la división celular tiene un tiempo estimado y número aproximado de células producto de la división, si el número de células después de llevarse a cabo el ciclo es inferior al esperado, se considera un efecto citostático sobre el cultivo posiblemente por el bloqueo en algún punto del ciclo celular [37] Por otra parte, para considerar el efecto citotóxico deben mantenerse controladas algunas variables entre ellas el tiempo, el cual no debe exceder las 48h en cada ensayo [38], y la concentración del compuesto a evaluar; según el NCI un compuesto citotóxico debe exhibir esta propiedad cuando se utiliza una concentración igual o menor a 1 µg/ml.

Aunque estos ensayos demuestran una supuesta inducción de apoptosis por actividad citotóxica del compuesto, se observa con base a los parámetros expuestos anteriormente que la PGG realmente no exhibe este tipo de actividad por varias razones. Primero, la IC<sub>50</sub> utilizada en las líneas tumorales varía en rangos de 25-75 µM, solamente en la línea de leucemia se observa una IC<sub>50</sub> relativamente menor, pero ninguna de estas concentraciones se considera citotóxica según el NCI y segundo, los tiempos utilizados en los ensayos superan las 48h, tiempo recomendado para los ensayos de citotoxicidad.

### **3.2.1.2 Arresto Del Ciclo Celular**

El arresto del ciclo celular es un evento favorable para la inducción de apoptosis de las células tumorales. La ciclina D, ciclina E, CDK2, CDK4 y CDK6, son proteínas reguladoras que controlan la progresión de la célula a la fase G1. Así mismo, el progreso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, es favorecido por la fosforilación de la proteína Rb (retinoblastoma) que a su vez es controlada por la actividad de los complejos ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2.

En la línea *Jurkat* de linfocitos T humanos, el tratamiento durante 12h con PGG a concentraciones entre 20-100 µM induce la acumulación de ubiquitina e inhibe la actividad del proteasoma 26S de conejo. También induce la expresión y control post-transduccional de las proteínas p27, p21 de forma dosis dependiente (10 µg/ml durante 24h), observándose arresto en la fase G1 del 87.12% de las células y disminución en el grado de fosforilación del Rb. También induce la expresión de Bax, acompañado de una liberación de citocromo c y aumento del DNA fragmentado [39].

La actividad biológica del PGG ha sido ampliamente investigada sobre líneas celulares de cáncer de seno. En un experimento utilizando diferentes líneas tumorales, los

investigadores tenían como uno de sus objetivos evidenciar cuál de las líneas utilizadas sobre-expresarán Skp2, con el fin de observar si la presencia de esta proteína era un condicional para que la PGG pudiera arrestar el ciclo celular, se seleccionaron las líneas MDA-231 y BT474, las cual fueron tratadas durante 48h con 5-20  $\mu\text{M}$  de PGG y 20-40  $\mu\text{M}$  de PGG, respectivamente. En las células MDA-231 se observó el 60% de las células arrestadas en fase G1, frente a un 42% de las células control. Mientras que en las células BT474 se observó el 62% de las células arrestadas en G1 frente a un 50% de las células control. Con el fin de investigar que proteínas del ciclo celular se ven afectadas por el tratamiento con PGG y son la causa del arresto en G1, se utilizaron concentraciones de 10 a 20  $\mu\text{M}$  de PGG durante 48h y se midieron las proteínas: ciclina B, ciclina D, ciclina E, Cdk2, Cdk4 y FoxO1, se concluyó que PGG altera los niveles de la ciclina D y aumenta los niveles de FoxO1 [1].

Se han realizado otros ensayos con células MCF-7 (cáncer de seno). En una de las publicaciones se utilizaron concentraciones iguales a 50  $\mu\text{M}$  en cada experimento, los resultados demuestran disminución del número celular en 24 h y marcado aumento en porcentaje de células arrestadas en G1. Para evidenciar las proteínas del ciclo celular que se ven afectadas con el tratamiento de PGG, durante 3-18 h se midieron los niveles de ciclina D1, ciclina D, ciclina E, CDK4 y CDK2, sin observarse cambios en estas, pero con el fin de elucidar el mecanismo de arresto en G1, se evaluó la actividad cinasa del complejo ciclina D/CDK4 y CDK2 utilizando Rb (769-921) y la histona H1, como sustratos, respectivamente; los resultados concluyen que PGG inhibe la actividad cinasa del complejo D/CDK4 y CDK2, este hallazgo se corrobora con la disminución en el grado de fosforilación del Rb. Adicionalmente, PGG logra aumentar los niveles de p27<sup>Kip</sup>, p21<sup>Cip</sup> (quinasas reguladoras del ciclo celular) y p53, generando arresto en fase G1 [9].

En otra publicación utilizando la misma línea celular, las células fueron tratadas con 0.5-80  $\mu\text{M}$  de PGG (24-72h) donde se observa un 62% de inhibición del crecimiento celular; utilizando 100 ng/ml de PGG por 30 min, se midió el grado de fosforilación de Ser 167 en el receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), se observa inhibición de la fosforilación y la disminución de los niveles de ER $\alpha$ , con el fin de investigar si la degradación procede vía proteasomal o lisosomal, se utilizaron los inhibidores carbobenzoxil-L-leucil-L-leucil-L-leucinal; 4-OH-A, 4-hidroxiandrostenediona (MG132) y cloroquina (CQ), respectivamente. El tratamiento con MG no muestra una reducción en los niveles del receptor, mientras que con CQ si se observa disminución de la proteína, lo cual sugiere que la degradación que favorece el PGG es vía lisosomal. El tratamiento con 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  de PGG durante 2-16h interfiere en la señalización ErB/PI3/Akt, finalmente se inhibe la expresión de la ciclina D1 (10-40  $\mu\text{M}$  durante 24h) [40].

Nuevamente, utilizando las líneas MCF-7 y MDA-231, en un ensayo de 3 días de incubación ambas líneas decrecen en número utilizando una concentración de 12.5  $\mu\text{M}$  de PGG, la sensibilidad de las células MCF-7 puede deberse a la activación de la apoptosis

mediada por caspasas evidenciada por la fosforilación en p53 y el clivaje de PARP. El arresto en el ciclo celular en las fases S y G1 de ambas líneas celulares se observa tras la utilización de 12.5  $\mu\text{M}$  de PGG en un periodo de 6-48 horas. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con 25-75  $\mu\text{M}$  de PGG en tiempos de 6 a 24h, no se observó ningún cambio en los niveles de p21 y p27, contrario a los resultados evidenciados por otros autores [41].

En cáncer de próstata, se utilizaron las líneas LNCaP y DU145 para evidenciar el arresto del ciclo celular. Las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de PGG durante 24 h se arrestan en la fase S, mientras que la adición de 20  $\mu\text{M}$  de PGG causa arresto en G1. Para entender mejor la dinámica de la acción de PGG sobre el ciclo celular, las células fueron tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de PGG (6-48 h), observando un rápido incremento de las células en fase G1 y una pequeña disminución de las células en fase S. Adicionalmente, para evaluar la duración del efecto de PGG sobre las células, se utilizaron concentraciones de 10, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de PGG durante 24h, luego se removió y las células se incubaron en un medio libre de PGG durante 24h más, los resultados demuestran que el efecto de PGG en el arresto celular se mantiene incluso después de 24h de haberse removido del medio y se concluye que la fase de arresto depende de la concentración de PGG con la cual se tratan las células [42].

Uno de los mecanismos de arresto de la fase S por parte de PGG es a través de la inhibición de la síntesis de DNA. Las células DU145 tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de PGG durante 24h y utilizando afidicolina como control inhibidor de la DNA polimerasa, demuestran una rápida disminución de la síntesis de DNA (disminución en los niveles de incorporación de BrdU), con este resultado el grupo sugiere que la PGG es capaz de inhibir la DNA polimerasa, incluso más rápido que la afidicolina [42]. Por otra parte, con el fin de definir los posibles mecanismos moleculares por los cuales PGG es capaz de inducir el arresto en el ciclo celular se investigaron las proteínas más importantes en la regulación del ciclo, el experimento se realizó en las células LNCaP las cuales fueron incubadas con 25-75  $\mu\text{M}$  de PGG durante 12-24h, se observó incremento de la expresión de P21Cip1 y P27Kip1 (*CDK inhibitor protein*), CDK4 y reducción de la expresión de la ciclina D1. Adicionalmente, los investigadores sugieren que el arresto en fase G1 y S no está relacionado directamente con la actividad de p53, sin embargo esta capacidad de PGG parece estar relacionada con la disminución de la concentración de ciclina D1 [19].

Aunque se presentan varias divergencias frente a los mecanismos biológicos que ejerce la PGG para arrestar el ciclo celular, esta si demuestra bloquear las fases S y G1, siendo más evidente el bloqueo en esta última, aparentemente esta actividad depende de la concentración de PGG que se utilice en el ensayo. Sin embargo, no hay claridad en cuanto a las proteínas reguladoras del ciclo celular que son afectadas por la PGG, algunos autores afirman la elevación de p27 y p21, mientras que otros no la observan, aunque existe esta discrepancia, todos concuerdan que PGG induce elevación de la ciclina D1 y disminución en la síntesis de DNA.

### 3.2.1.3 Autofagia

La autofagia es un proceso autodegradativo relacionado con la muerte celular programada medida por lisosomas, la célula puede eventualmente desencadenar este mecanismo de supervivencia bajo condiciones de estrés (hipoxia, escasas de nutrientes, etc), sin embargo, cuando la condición de estrés es excesiva el proceso avanza hasta el punto que ocasiona la muerte de la célula, esto se hace mediante el daño provocado a organelos como la mitocondria y el retículo endoplasmático con el fin de obtener ATP. Para evaluar este proceso se utilizan varios marcadores como las formas derivadas de LC3 -proteína asociada a microtúbulos-, de la cual se identifican dos formas, la LC3-I ubicada en el citosol y LC3-II que se caracteriza por presentar un modificación lipídica por la adición de fosfatidiletanolamina al carbono terminal y posterior migración hacia la membrana de los autofagosomas (vesículas de doble membrana donde se desarrolla la hidrólisis por medio de la unión con lisosomas) en las primeras fases de la autofagia, esta proteína se puede detectar utilizando anticuerpos marcados con un fluorocromo lo cual evidenciara la formación de autofagosomas en la célula.

En las líneas PC-3 y TRAMPC-2 de cáncer de próstata, el tratamiento durante 24, 48 y 72 horas con 12.5, 25, 50, 75  $\mu\text{M}$  de PGG induce en PC-3 la elevación de LC3-I y LC3-II y una elevación de la forma LC3-II en TRAMPC-2, junto con la inducción de la formación de autofagosomas en las dos líneas. Los investigadores sugieren que la inducción de autofagia se asocia con la inhibición de la fosforilación de mTOR debido a la inactivación de los sustratos S6K y 4EBP1, en ambas líneas celulares [34]. En la línea tumoral MDA-MB231, la PGG (12.5  $\mu\text{M}$ ) induce autofagia en las células, tras el incremento en la fosforilación de AMPK y la expresión de LC-3II (24-48 horas) [41].

La autofagia es un tipo de muerte celular caracterizada por la formación de autofagosomas en los cuales se lleva a cabo la degradación de organelos por las enzimas lisosomales, PGG es capaz de inducir este tipo de muerte en algunas líneas tumorales de cáncer de próstata y de seno. Es importante destacar que en ambas líneas celulares se observó el incremento del marcador específico para autofagia LC-3II, con tiempos y concentraciones de PGG similares. Según lo expuesto por los investigadores, la célula debe desencadenar uno de los dos tipos de muerte celular, pero para probar esta hipótesis deben llevarse a cabo ensayos que mantengan las mismas condiciones y concentraciones de PGG, empleando como control las líneas tumorales en las cuales ya se ha observado la inducción de apoptosis o inducción autofagia, y determinar si la célula opta por desarrollar solo uno de estos dos procesos para desencadenar la muerte celular inducida por PGG.

### 3.3 INHIBICIÓN DE BOMBAS DE RESISTENCIA

Las bombas de resistencia son proteínas transmembranales dependientes de ATP, encargadas de expulsar xenobióticos del interior de la célula como: alcaloides, taxanos, antraciclinas, entre otras. Un ejemplo, es la proteína ABC, un complejo proteico compuesto por la glicoproteína P (P-gp) y la proteína de multi-resistencia a fármacos 1 (MDRP1), sobre-expresadas en varios tipos de cáncer, esta falta de control altera la efectividad de los medicamentos, al disminuir la acumulación intracelular y tiempo de permanencia del fármaco dentro de la célula.

La línea celular KB-C2 de carcinoma epitelial sobre-expresa P-gp, el tratamiento con 40-100  $\mu\text{M}$  de PGG induce acumulación en el interior y disminución de la salida de los sustratos rodamina 123 y daunorubicina e inhibe la actividad ATPasa inducida por verapamilo. Esto demuestra que PGG es capaz de bloquear la actividad de P-gp favoreciendo la permanencia de los fármacos en el interior de las células tumorales que sobre-expresan esta proteína [43].

Un efecto similar se ha observado en las líneas Hep-G2 de hepatocarcinoma y HTB-140 de melanoma. La incubación de la línea HTB-140 con 1  $\mu\text{M}$  de vincristina (VCR) y 25  $\mu\text{g/ml}$  de un extracto que contiene PGG en mayor proporción, se observó reducción en la viabilidad celular, aumento de muerte celular y disminución de la síntesis intracelular de ATP, aunque no se observó el mismo efecto en la línea Hep-G2 las cuales fueron menos sensibles al procedimiento. Estos resultados sugieren que PGG puede incrementar la inhibición de la bomba de multi-resistencia MRP1, especialmente en la línea de melanoma y que el tratamiento de PGG en esta línea celular resulta ser mejor inhibidor de la MRP1 que la indometacina [44].

El éxito de la quimioterapia contra el cáncer depende en gran medida de la inhibición de las bombas de resistencia a fármacos. La sobre-expresión y actividad de estas proteínas genera que la célula expulse el medicamento de su interior antes de que el fármaco pueda ejercer su efecto sobre la célula tumoral. Aunque en los ensayos anteriores las condiciones y concentraciones no son las mismas, la PGG es capaz de inhibir la actividad ATPasa de la P-gp y en menor magnitud la MRP1 de las líneas tumorales utilizadas, sin embargo, no es claro el efecto *in vivo* de estas bombas ya que son expresadas en la mayoría de células y no han mostrado efectividad clínica.

### 3.4 ACTIVIDAD ANTIMETASTÁSICA

La metástasis es la migración de las células tumorales hacia otros sitios anatómicos a través de los vasos sanguíneos y linfáticos. Involucra la secreción de metaloproteinas (MMP), proteínas que degradan la matriz extracelular, principalmente la MMP-1, MMP-2 y MMP-9, por otra parte se encuentran el factor de crecimiento epidermal (EGF) y EVGF, y

el factor de transcripción STAT-3, promotores de angiogénesis que indirectamente contribuyen a la metástasis.

La administración oral de 10 mg/kg de PGG en ratones *nude* xenoinjertados con células MDA-MB231, disminuye la incidencia de metástasis a pulmón en un 12.5% contra un 50% de los ratones control. Adicionalmente, disminuye el número de vasos sanguíneos alrededor de las células tumorales y los niveles intracelulares de STAT3 y las proteínas reguladoras VEGF y Bcl-2. Para evaluar el mecanismo mediante el cual PGG afecta los niveles de STAT3 *in vitro*, los investigadores utilizaron 10  $\mu$ M de PGG durante 4h en la misma línea celular, evidenciando inhibición en la fosforilación de STAT3 [4].

En la línea B16F10 de melanoma, el tratamiento durante 12h con una  $IC_{50}$  igual a 15  $\mu$ M de PGG inhibe los niveles de invasión en el matrigel, disminuye la actividad, los niveles y el mRNA de MMP-9. Utilizando concentraciones de 5  $\mu$ M y 15  $\mu$ M de PGG durante 12h, se observa inhibición de la unión de los factores de transcripción AP-1, Sp-1 y c-Jun, sugiriendo que PGG afecta la actividad del promotor de la MMP-9 [45].

En la línea PC-3 de cáncer de próstata, el tratamiento con 5-40  $\mu$ M de PGG durante 48h inhibe la invasión de las células PC-3 independientes de andrógenos, además utilizando 10  $\mu$ M de PGG durante 12 h, se observa inhibición del mRNA de la MMP-9 inducida por EGF, inhibición de la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B, incremento de la traslocación de c-jun y c-fox, inhibición de la fosforilación de JNK2 y EGFR y supresión de la degradación de I- $\kappa$ B $\alpha$ . Para evaluar la capacidad antimetastásica de PGG, se utilizaron ratones *nude* inyectados intratibialmente con  $1 \times 10^6$  células de PC-3 y se trataron con 25 mg/kg vía intraperitoneal, se observó una disminución en la osteolisis y tumorigénesis visualizada con rayos X [3].

Una de las actividades más investigadas de la PGG es la inhibición de la metástasis. PGG se postula como un compuesto anti-metastásico porque es capaz de inhibir las vías de señalización de STAT3, lo cual disminuiría la expresión de VEGF y Bcl-2. La sobre-expresión de Bcl-2 se ha asociado con la progresión maligna de las células tumorales ya que contribuye a la inhibición de la apoptosis, por esta razón es importante evaluar los niveles de la proteína en los procesos metastásicos [48]. Adicionalmente regula la expresión de la MMP-9, efecto dado por el bloqueo de PGG a los factores de transcripción (AP-1, Sp-1 y c-Jun) necesarios para la activación del promotor de la MMP-9.

### **3.4 ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA**

La angiogénesis es un proceso biológico mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, este evento favorece el crecimiento y metástasis de las células tumorales. Algunos factores pueden favorecer la actividad angiogénica en los tumores, principalmente la hipoxia, factor de crecimiento de fibroblastos (bFbF), VEGF,

HIF-1. Los efectos de la PGG han sido observados en líneas celulares de cáncer de pulmón, cáncer de seno y cáncer de próstata [4, 33, 46]

La actividad antiangiogénica *in vitro* ha sido evidenciada en células humanas de cordón umbilical (HUVECs), este experimento se efectúa en un tiempo de 48h y se utilizan concentraciones de 3  $\mu$ M y 8  $\mu$ M de PGG, observándose la inhibición de la proliferación celular inducida por bFGF y la reducción de la formación de estructuras similares a capilares. De igual forma, el tratamiento con 1-10  $\mu$ M de PGG durante 24h inhibe la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y VEGF, reduce los niveles de PGE2 y VEGF, inducidos por bFGF. Con el fin de investigar el mecanismo de inhibición de la angiogénesis por parte de PGG, se utilizaron 1-20  $\mu$ M de PGG durante 48h, los resultados sugieren que la inhibición podría ser el resultado de la disminución de la fosforilación de ERK y JNK y la activación de la expresión de p38.

Ensayos *in vivo* demuestran que PGG inhibe la angiogénesis *in vivo*. Con el fin de evaluar la inhibición de la vascularización inducida por bFGF, se utilizaron membranas corioalantoideas (CAM) de huevos y matrigel. Las CAM fueron tratadas con 1  $\mu$ g de PGG/huevo durante 72h de incubación y se evidencio disminución de la formación de vasos sanguíneos. Así mismo, el matrigel inyectado vía subcutánea a ratones (0.5 ml que incluían 80  $\mu$ g de PGG y 300 ng de bFGF) y extraído después de 7 días después de su implantación, demuestra una reducción hasta del 30 % del contenido de hemoglobina con respecto al control. Adicionalmente, el tratamiento con 4 y 20 mg/kg de PGG durante 4 días suprime la angiogénesis inducida por las células tumorales *Lewis Lung Cancer* (LLC) inoculadas en ratones evidenciada por la disminución del número de vasos sanguíneos alrededor de las LLC [33].

Ratones xenoinjertados con células MDA-MB231 de cáncer de seno y tratados con 10 mg/kg de PGG por semana, mostraron una inhibición de la fosforilación de STAT3 dando como resultado la alteración de la expresión de las proteínas VEGF y Bcl-2 [4].

La línea LNCaP de cáncer de próstata sometida a condiciones de hipoxia y tratada con 0, 25, y 50  $\mu$ M de PGG durante 6h, mostró una reducción de la hipoxia inducida por la expresión de HIF-1, inhibición de la transcripción y traslocación nuclear de HIF-1 y disminución de los niveles intracelulares y extracelulares de VEGF previniendo la formación de vasos sanguíneos [46].

La angiogénesis es un proceso mediante el cual la célula tumoral puede obtener más nutrientes y oxígeno para crecer. Un compuesto anti-angiogénico debe ser capaz de inhibir la hipoxia y bloquear las proteínas involucradas en este proceso como son el VEGF, bFGF, COX-2 y HIF-1. Estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando PGG demuestran la capacidad del compuesto de disminuir el número de vasos sanguíneos y la hipoxia, junto con la inhibición de la expresión de VEGF, COX-2, HIF-1 y STAT3.

### 3.5 ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* SOBRE EL TUMOR PRIMARIO

La disminución en la proliferación celular y tamaño del tumor son evidencias de la actividad antitumoral de un compuesto. La utilidad de un compuesto en los ensayos en animales de experimentación constituye el punto final de la etapa pre-clínica que abre el camino para el desarrollo de estudios clínicos de los compuestos con potencial de llegar a ser un fármaco.

Se han realizado varios estudios en modelos animales inoculados con diferentes clases de tumores. En cáncer de pulmón, la administración intraperitoneal de 4 a 20 mg/kg/día de PGG durante 17 días, evidencio en cortes histológicos un aumento en el número de células positivas para TUNEL y disminución del número de células positivas para PCNA, ya que estos ensayos se realizan para evidenciar la inducción de apoptosis, se concluye que la PGG es capaz de provocar este tipo de muerte celular en el tumor primario [33].

En cáncer de seno, el tratamiento oral diario de 10 mg/Kg de PGG durante 40 días postinoculación en hembras de ratón *nude athymic BALB-c* xenoinjertados con un millón de células MDA-MB231 disminuye el crecimiento tumoral en un 49.3% el cual es significativamente más alto, comparado con un 21.4% del efecto causado por la administración intraperitoneal de Taxol, bajo las mismas dosis, cabe resaltar que el tratamiento con PGG no afecto el peso de los ratones [4].

En cáncer de próstata, la inyección intratibial de un millón de células PC-3 en ratones *nude* junto con el tratamiento de 25 mg/kg de PGG, inhibe la tumorigénesis sin afectar el peso final de los ratones [3]. En otro ensayo, el tratamiento diario (7 días) con administración intraperitoneal de 20 mg/Kg de PGG en ratones machos *BALB/c athymic nude* inyectados subcutáneamente con  $2 \times 10^6$  células de la línea DU145, se observa una disminución significativa del crecimiento tumoral y disminución del peso final del tumor en un 53% [35].

La actividad *in vivo* de un compuesto, es una de las primeras investigaciones que debe hacerse antes de pasar a ensayos clínicos. PGG exhibe actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos animales xenoinjertados con células tumorales de cáncer de seno, cáncer de pulmón y cáncer próstata junto con la administración oral o intraperitoneal del compuesto con concentraciones que varían en un rango de 4-25 mg/kg, observándose la inhibición del crecimiento tumoral sin pérdida de peso corporal de los animales (baja toxicidad), el cual es un hallazgo importante para proponer a PGG como posible fármaco con actividad antitumoral para ensayos clínicos.

### **3.6 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y SU IMPORTANCIA EN CÁNCER**

La inflamación es un proceso inmunológico efectuado para el control de la diseminación de microorganismos presentes en una lesión; es el resultado de complejas interacciones moleculares entre células endoteliales, macrófagos, monocitos, polimorfonucleares (PMN) y linfocitos, los cuales secretan citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y otras sustancias, en un proceso denominado quimiotaxis.

Aunque este proceso debe ser limitado en tiempo y espacio, en cáncer suele ser permanente, generando un descontrol en la respuesta inmune que da como resultado una constante activación de vías de señalización involucradas en la supervivencia y proliferación celular. Una de las moléculas que interviene en este proceso crónico es la interleucina-8 (IL-8), esta molécula no es expresada constitutivamente y es regulada por TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B, desempeña un papel muy importante en el reclutamiento de macrófagos y monocitos al sitio afectado, regula la adhesión celular, activa granulocitos y contribuye a la liberación de ROS.

La línea U937 de monocitos humanos libera IL-8 en respuesta a estímulos de los PMN o TNF- $\alpha$ . El tratamiento con 5-20  $\mu$ M de PGG durante 24 h, inhibe la expresión del mRNA de la IL-8, disminuye la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B e inhibe la degradación de I- $\kappa$ B $\alpha$  (proteína inhibitoria que retiene a NF- $\kappa$ B en el citoplasma, su degradación permite la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo). Adicionalmente, inhibe la producción de IL-8 inducida por TNF- $\alpha$  inactivando a NF- $\kappa$ B [47].

Varias investigaciones han demostrado la relación entre la inflamación crónica y el cáncer. La PGG regula la liberación de IL-8, lo cual puede contribuir a la disminución de procesos inflamatorios, ya que esta interleucina participa en el reclutamiento de células de la respuesta inmune innata al sitio de lesión.

### **3.8 CO-TRATAMIENTO**

En el tratamiento contra el cáncer se utilizan en conjunto diferentes clases de quimioterapéuticos, algunos con efectos secundarios más agresivos que otros, dependiendo el grado de citotoxicidad que presente. Dado que los quimioterapéuticos no son específicos para la células tumorales, los efectos deletéreos se manifiestan con frecuencia en los pacientes, no obstante, los especialistas optan por el uso alternado de fármacos con el fin de disminuir los daños causados por la quimioterapia. Con base en esta necesidad, se podría plantear la posible acción de PGG en el incremento de la citotoxicidad de algún quimioterapéutico o la disminución de ciertos efectos desfavorables en el paciente.

Un ensayo realizado en las células MDA-231 demuestra que el tratamiento de las células incubadas durante 48h con 5  $\mu$ M de Tamoxifen y 15  $\mu$ M de PGG, disminuye a un 36.4% la viabilidad de esta línea celular en comparación con un 94.8 % de viabilidad en las células tratadas únicamente con Tamoxifen [1].

Por otro lado, las líneas tumorales HTB-140 y Hep G2 pre-incubadas con 1  $\mu$ M de VCR y 25  $\mu$ g/ml de PGG durante 2 h, disminuye a un 70% aproximadamente la viabilidad celular frente a 100% observado en las células tratadas solo con VCR. Además, el mismo tratamiento aumento el porcentaje de LDH aproximadamente a un 20% frente a un 10% del control [44].

La administración de PGG en conjunto con otros quimioterapéuticos parece ser otro uso para este compuesto. Los resultados obtenidos del ensayo realizado en las células MDA-231 son más indiscutibles que los ensayos realizados en las células HTB-140 y Hep G2. Resulta ser mejor evidencia de que PGG actúa en sinergia con el Tamoxifen, porque se muestran los ensayos sincronizados tras la adición de ambos compuestos y cada uno por separado, siendo más útil para el lector apreciar la diferencia entre los resultados en conjunto y por separado de cada compuesto. Mientras que en el otro ensayo, no es claro el aporte que hace PGG en la disminución de la viabilidad celular, porque no muestran porcentajes de viabilidad de los compuestos por separado, siendo más difícil apreciar el efecto que realmente ejerce PGG junto con la VCR.

### **3.7 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN ANIMALES**

Recientemente se publicó un protocolo de extracción de PGG a partir del plasma, Li L y colaboradores, utilizaron la similitud existente entre el EPGC y la PGG, adaptando la técnica de extracción de EPGC para la obtención de PGG. La modificación de este protocolo es la adición de ácido ascórbico –antioxidante-, luego utilizan ácido acético al 2% y por último hacen la extracción con acetato de etilo. Sus resultados a partir 100  $\mu$ L de plasma de ratones C57BL/6, demuestran que la recuperación de PGG utilizando acetato de etilo es del 43%, mientras que utilizando la acidificación previa a la extracción con acetato de etilo el porcentaje de recuperación se incrementa a un 72%, entonces se concluye que la acidificación del medio para la extracción de PGG a partir del plasma debe hacerse utilizando ácido acético.

Hasta el momento no existen ensayos clínicos en personas, que demuestren que PGG no presente efectos secundarios en contra de la salud y el bienestar de los pacientes. Aunque los investigadores no reportan cambio en el peso de los animales tratados vía oral con el compuesto, se deben hacer más estudios que generen datos sobre el metabolismo, toxicidad y excreción de la PGG.

#### 4. CONCLUSIONES

La recopilación de literatura hecha en esta revisión bibliográfica ha sido de gran utilidad para resaltar las diferentes actividades biológicas que exhibe la PGG en ensayos *in vitro* e *in vivo*. A partir del análisis de los artículos publicados, podemos concluir:

1. La PGG no exhibe actividad citotóxica en las líneas de cáncer de pulmón (LLC), cáncer de próstata (TRAMP), cáncer de hígado (SK-HEP-1) y leucemia (HL-60), debido a que las concentraciones utilizadas para los ensayos están dentro del rango 25-75  $\mu\text{M}$  de PGG, las cuales se consideran concentraciones elevadas en comparación con 1  $\mu\text{M}$  que corresponde a la concentración límite empleada por el NCI para establecer que un compuesto es citotóxico. Adicionalmente, los tiempos de los ensayos son prolongados, puesto que la mayoría de los investigadores utilizaron más de 48h de incubación de las células, dando como resultado una falsa apreciación de la citotoxicidad de la PGG, esta afirmación se puede corroborar con los resultados de otros observadores quienes aseguran que la exposición prolongada de la células con la PGG si causa disminución en el porcentaje de viabilidad celular.
2. El arresto en la fase G1 es una de las actividades más discutidas por los autores. Aunque se aprecia el arresto en esta fase, todavía se desconoce el mecanismo mediante el cual PGG ejerce este efecto. El bloqueo del ciclo celular induce la muerte de las células tumorales y este sería un evento atribuible a la PGG, es decir, que PGG si induciría la muerte celular como resultado de un efecto indirecto sobre la proliferación celular.
3. La actividad antiangiogénica y antimetastásica son funciones que puede desempeñar la PGG tanto *in vivo* como *in vitro*. Este compuesto es capaz de inhibir la actividad y/o los niveles de las proteínas mediadoras de estos procesos como la MMP-9, VEGF y COX-2. También disminuye la hipoxia inducida por la expresión de HIF-1.
4. La inhibición de las bombas de resistencia a fármacos es una actividad que debe seguir evaluándose en otras líneas tumorales e *in vivo*. Aparentemente PGG logra inhibir la función de la P-gp, pero no hay claridad en el efecto sobre MRP1 ya que en este ensayo la comparación que hacen los autores entre la acción de PGG vs Indometacina no es evidente y la adición de PGG no se hizo en simultaneo con la VCR, de esta forma es difícil observar si el efecto sobre la viabilidad y muerte celular es debida al fármaco o al compuesto.
5. Uno de los ensayos más importantes para evaluar la efectividad de un compuesto antitumoral, son los que se hacen *in vivo*. Ya que PGG ha demostrado actividad

biológica *in vitro* en varias líneas tumorales, se ha proseguido a realizar experimentos en modelos animales xenoinjertados con células tumorales de cáncer de seno, cáncer de pulmón y cáncer próstata. La administración oral o intraperitoneal del compuesto en concentraciones que oscilan los rangos entre 4-25 mg/kg, demuestra inhibición del crecimiento tumoral sin pérdida de peso corporal de los animales, por este hallazgo se podría suponer que el compuesto tiene baja toxicidad, lo cual se convierte en un hallazgo importante para proponer a PGG como posible fármaco con actividad antitumoral para ensayos clínicos.

6. La actividad antiinflamatoria que exhibe la PGG es un valor agregado que podría servir de apoyo para la quimioterapia contra algunos tipos de cáncer que son capaces de producir un ambiente inflamatorio crónico que generan estímulos permanentes de proliferación y supervivencia en las células tumorales.
7. Una actividad evidenciada durante esta revisión es la capacidad que tiene PGG de actuar en sinergia con fármacos quimioterapéuticos. Aunque se observa que potencializa la acción del Tamoxifen y la VCR, podrían incluirse más fármacos antitumorales en estos estudios de co-tratamiento, no solo con el fin de apreciar la interacción entre estos, sino para evaluar si PGG puede disminuir los efectos deletéreos generados en los pacientes por la toxicidad de algunos medicamentos utilizados para combatir el cáncer.
8. Aunque en la actualidad no se han reportados ensayos clínicos con PGG, la actividad *in vitro e in vivo* descrita con anterioridad, son argumentos para dar paso a estas investigaciones. Los tratamientos suministrados a los animales conservan una dosis similar entre cada grupo de investigación. Uno de los hallazgos más importante es la baja toxicidad que demuestra el compuesto, puesto que los animales no perdieron peso durante todo el tratamiento, evento que por el contrario si sucede en varias ocasiones con los fármacos antitumorales.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Huang, H.C., C.L. Lin, and J.K. Lin, *1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose, quercetin, curcumin and lycopene induce cell-cycle arrest in MDA-MB-231 and BT474 cells through downregulation of Skp2 protein*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(12): p. 6765-75.
2. Zhang, J., et al., *Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose*. Pharm Res, 2009. **26**(9): p. 2066-80.
3. Kuo, P.-T., *Penta-O-galloyl--D-glucose Suppresses Prostate Cancer Bone Metastasis by Transcriptionally Repressing EGF-Induced MMP-9 Expression*. Agricultural and Food Chemistry 2009. **57**: p. 3331-3339.
4. Lee, H.J., et al., *Oral administration of penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition*. Carcinogenesis, 2011. **32**(6): p. 804-11.
5. Li, L., et al., *Preparation of penta-O-galloyl-beta-D-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analyses by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC*. J Pharm Biomed Anal, 2011. **54**(3): p. 545-50.
6. Chen, D. and Q.P. Dou, *Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy*. Int J Mol Sci, 2008. **9**(7): p. 1196-206.
7. Okuda, T., *Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants*. Phytochemistry, 2005. **66**(17): p. 2012-31.
8. Jäderlund, O., J. Plant, J. C. da Silva Filho, P. Ferreira, W. Hayes, I. Mueller-Harvey, D. J. Evason, M.D Mills, V Parr, *MALDI-TOF Mass Spectrometric Analysis of Hydrolysable Tannins*, 2002, El Hadrami I.: Universit´e Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco. p. 491-492.
9. Chen, W., *Induction of G1 phase arrest in MCF human breast cancer cells by pentagalloylglucose through the down-regulation of CDK4 and CDK2 activities and up-regulation of the CDK inhibitors p27Kip and p21Cip*. Biochemical Pharmacology, 2003.
10. Oh, G.S., et al., *In vitro anti-proliferative effect of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose on human hepatocellular carcinoma cell line, SK-HEP-1 cells*. Cancer Lett, 2001. **174**(1): p. 17-24.
11. Hanahan, D., *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
12. Holland, J.F., W.K. Hong, and R. American Association for Cancer, *Holland-Frei cancer medicine 8*, 2010, Shelton, Conn.: People's Medical Pub. House.
13. Skeel, R.T., *Quimioterapia del cáncer*. 5 ed, 2000, España: MARBAN, LIBRERIA EDITORIAL. 726.
14. Zitvogel, L., et al., *Immunological aspects of cancer chemotherapy*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 59-73.
15. Souhami, R.L. and J.S. Tobias, *Cancer and its management* 2005: Wiley-Blackwell.
16. M, G., *Anticancer agents from natural products*. 2005.
17. Quideau, S., et al., *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011.
18. Qiao, Y., et al., *Cell growth inhibition and gene expression regulation by (-)-epigallocatechin-3-gallate in human cervical cancer cells*. Arch Pharm Res, 2009. **32**(9): p. 1309-15.
19. Zhu, B.H., et al., *[(-)-Epigallocatechin-3-gallate reduces vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer cells via suppressing activity]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2011. **14**(8): p. 631-5.

20. Hoffmann, J., et al., *EGCG downregulates IL-1RI expression and suppresses IL-1-induced tumorigenic factors in human pancreatic adenocarcinoma cells*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **82**(9): p. 1153-62.
21. Hussain, A.R., et al., *Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24703.
22. George, J., et al., *Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23395.
23. Bae, S., et al., *Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells*. *Mol Cells*, 2011. **32**(3): p. 243-9.
24. Mizuno, H., et al., *Theaflavin-3, 3'-digallate induces epidermal growth factor receptor downregulation*. *Mol Carcinog*, 2006. **45**(3): p. 204-12.
25. Lee, H.H., C.T. Ho, and J.K. Lin, *Theaflavin-3,3'-digallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit rat liver microsomal 5alpha-reductase activity and the expression of androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(7): p. 1109-18.
26. Aggarwal, S., et al., *Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling*. *Int J Cancer*, 2004. **111**(5): p. 679-92.
27. Yoysungnoen, P., et al., *Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2005. **33**(2): p. 127-35.
28. Lakshman, M., et al., *Dietary genistein inhibits metastasis of human prostate cancer in mice*. *Cancer Res*, 2008. **68**(6): p. 2024-32.
29. Santell, R.C., N. Kieu, and W.G. Helferich, *Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice*. *J Nutr*, 2000. **130**(7): p. 1665-9.
30. Chen, D., et al., *Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **69**(10): p. 1421-32.
31. Yang, Y.M., et al., *Quercetin inhibits alpha-MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells*. *Phytother Res*, 2011. **25**(8): p. 1166-73.
32. Djakpo, O. and W. Yao, *Rhus chinensis and Galla Chinensis--folklore to modern evidence: review*. *Phytother Res*, 2010. **24**(12): p. 1739-47.
33. Huh, J.E., et al., *Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein kinase pathways*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(8): p. 1436-45.
34. Hu, H., *Penta-galloyl-glucose induces autophagy and caspaseindependent programmed deaths in human PC-3 and mouse TRAMP-C2 prostate cancer cells*. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009. **8**(10): p. 2833-2843.
35. Hu, H., *Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-B-D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells in vitro and suppresses prostate xenograft tumor growth in vivo*. *Molecular Cancer Therapies* 2008. **7**(9): p. 2681-2691.
36. Pan, M.H., et al., *Induction of apoptosis by penta-O-galloyl-beta-D-glucose through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells*. *Eur J Pharmacol*, 1999. **381**(2-3): p. 171-83.
37. Irwin, W.A., Jelic D., Antolovic R., *Biomarkers for Drug Discovery: Important Aspects of in vitro Assay Design for HTS and HCS Bioassays*. *Croatica Chemica Acta*, 2008. **1**(81): p. 8.

38. Teicher, B.A. and P.A. Andrews, *Anticancer Drug Development Guide : Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval* 2004: Humana Press. 450p.
39. Chen, W.J. and J.K. Lin, *Induction of G1 arrest and apoptosis in human jurkat T cells by pentagalloylglucose through inhibiting proteasome activity and elevating p27Kip1, p21Cip1/WAF1, and Bax proteins.* J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13496-505.
40. Hua, K.T., T.D. Way, and J.K. Lin, *Pentagalloylglucose inhibits estrogen receptor alpha by lysosome-dependent depletion and modulates ErbB/PI3K/Akt pathway in human breast cancer MCF-7 cells.* Mol Carcinog, 2006. **45**(8): p. 551-60.
41. Chai, Y., et al., *Penta-O-galloyl-beta-D-glucose induces G1 arrest and DNA replicative S-phase arrest independently of P21 cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, P27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B and P53 in human breast cancer cells and is orally active against triple-negative xenograft growth.* Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R67.
42. Hu, H., *Penta-O-galloyl-beta-D-glucose induces S- and G1-cell cycle arrests in prostate cancer cells targeting DNA replication and cyclin D1.* Carcinogenesis, 2009. **30**(5): p. 818-823.
43. Kitagawa, S., et al., *Inhibition of P-glycoprotein function by tannic acid and pentagalloylglucose.* J Pharm Pharmacol, 2007. **59**(7): p. 965-9.
44. Jaszewska, E., *Oenothera paradoxa defatted seeds extract containing pentagalloylglucose and procyanidins potentiates the cytotoxicity of vincristine.pdf.* 2010.
45. Ho, L.-L., *Penta-O-galloyl-h-D-glucose inhibits the invasion of mouse melanoma.* 2002.
46. Park, K.-Y., *1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose Suppresses Hypoxia-Induced Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 and Signaling in LNCaP Prostate Cancer Cells.* Biological & Pharmaceutical Bulletin 2010. **33**(11): p. 1835-1840.
47. Oh, G.S., et al., *Penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibits phorbol myristate acetate-induced interleukin-8 gene expression in human monocytic U937 cells through its inactivation of nuclear factor-kappaB.* Int Immunopharmacol, 2004. **4**(3): p. 377-86.
48. Miyake, H., et al., *Overexpression of Bcl-2 enhances metastatic potential of human bladder cancer cells.* British Journal of Cancer, 1999, **79** (11/12): p. 1651–1656.