



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Estudio de la capacidad antiproliferativa en  
modelos celulares de cáncer de mama de un  
extracto de hoja de olivo enriquecido en  
polifenoles**

Doctoranda:

**María Losada Echeberría**

Directores:

**Dr. Enrique Barraión Catalán**

**Dr. Vicente Micol Molina**

Tesis Doctoral

Elche (Alicante), 2019





Este trabajo se presenta en la modalidad de tesis convencional y para, justificar los indicios de calidad del mismo, se presenta el siguiente trabajo de revisión previamente publicado como primera firmante:

María Losada-Echeberría, María Herranz-López, Vicente Micol, Enrique Barrajió-Catalán. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants* **2017**, 6, 88.

Con los siguientes índices de calidad:

- Número de citas según Web of knowledge 7, según CrossRef 11 y según Google scholar 17.
- *CiteScore* (2017) de 3.56 e indexado en las áreas de:
  - “*Biochemistry, Genetics and Molecular Biology – Clinical Biochemistry*” - Posición: 21/128 (Q1)
  - “*Biochemistry, Genetics and Molecular Biology – Physiology*” - Posición: 33/169 (Q1)
  - “*Biochemistry, Genetics and Molecular Biology – Biochemistry*” - Posición: 92/402 (Q1)
- *ESCI* 2016 -2017 y *JCR* (2018) de 4.52 e indexado en las áreas de:
  - “*Food Science & Technology*” - Posición: 10/135 (Q1)
  - “*Biochemistry & Molecular Biology*” - Posición: 63/298 (Q1)
  - “*Chemistry, Medicinal*” 6/61- Posición: (Q1)

Para que conste a los efectos oportunos firma el presente documento en Elche (Alicante), a de de 2019.

**Fdo.**

**María Losada Echeberría**





**Dr. Vicente Micol Molina**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández y **Dr. Enrique Barraji3n Catal3n**, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad Miguel Hern3ndez del Departamento de Ingenier3a, 3rea de Farmacia y Tecnolog3a Farmac3utica,

**CERTIFICAN QUE:**

El trabajo de investigaci3n que conduce a la obtenci3n del grado de Doctora: "Estudio de la capacidad antiproliferativa en modelos celulares de c3ncer de mama de un extracto de hoja de olivo enriquecido en polifenoles" del que es autora D3a. Mar3a Losada Echeberr3a se ha realizado bajo su direcci3n en el Instituto de Investigaci3n, Desarrollo e Innovaci3n en Biotecnolog3a Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hern3ndez de Elche.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche (Alicante), a de de 2019.

**Fdo.**

**Dr. Vicente Micol Molina**

**Dr. Enrique Barraji3n Catal3n**





**Dr. Ricardo Mallavia Marín**, Catedrático de Química Inorgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche y coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología sanitaria de Elche de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

### CERTIFICA

Que la doctoranda María Losada Echeberría ha completado el Programa de formación Doctoral en Biología Molecular y Celular, alcanzando los objetivos establecidos en el mismo. Y que la tesis reúne los indicios de calidad exigidos para el campo de evaluación. La estudiante es la primera firmante del siguiente artículo:

Losada-Echeberría, M; Herranz-López, M; Micol,V; Barraión-Catalán, E. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants* **2017**, 6, 88.

Con los siguientes índices de calidad:

- *CiteScore* (2017) de 3.56 e indexado en las áreas de:  
"Biochemistry, Genetics and Molecular Biology – Q1"
- *ESCI* 2016 -2017 y *JCR* (2018) de 4.52 e indexado en las áreas de:  
"Food Science & Technology"- Q1  
"Biochemistry & Molecular Biology"- Q1  
"Chemistry, Medicinal"- Q1

Para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Elche (Alicante), a de de 2019.

Fdo.

**Dr. Ricardo Mallavia Marín**





## Agradecimientos

Dicen que es de bien nacido ser agradecido, por ello en estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que han contribuido a que este trabajo se lleve a cabo.

Primero de todo agradecer a mis directores, el **Dr. Enrique Barraón** y el **Dr. Vicente Micol**, por darme la oportunidad de realizar esta tesis e iniciarme en el mundo de la ciencia, así como por su apoyo y dirección durante esta etapa.

Agradecer al **Instituto de Investigación, Desarrollo e innovación en Biotecnología sanitaria de Elche (IDI BE)** y a su personal técnico y administrativo, por la colaboración directa e indirecta en la elaboración de este trabajo.

A todos mis compañeros del **Grupo de Compuestos Bioactivos Naturales**, presentes y pasados, gracias por el apoyo y compañerismo mostrado. A la **Dra. Almudena Pérez**, porque sin su ayuda y consejo esta tesis no existiría, por la labor de dirección que nos presta a todas sin buscar reconocimiento por ello, por sus operaciones “submarino” que al final siempre salen a flote y por los viernes de Pepsi. A **Luz María**, mi mentora de cultivos, por hacer que sienta que no soy tan friki, por nuestros debates políticos y sus recomendaciones de libros. A **Verónica**, por entender que a veces una solo necesita quejarse, compartir penas, mi compañera de lamentos estos últimos meses. A **Noelia**, la otra murcianica del grupo, por ser mi maga del HPLC. A **Mayte**, por ser esa persona siempre dispuesta a ayudarnos, aunque sea a rotular montañas de tubos para “musear”.

También agradecer a la **Dra. Diana Cittelly** y a los miembros de su grupo, los **Dres. M<sup>a</sup> José Contreras, Paola Ortiz, Alejandro Márquez y Nicole Day**, que me acogieron y de los que tanto aprendí, por hacerme sentir como en casa a más de 8000 Km.

Al grupo del **Dr. Antonio Segura Carretero** y al grupo de la **Dr. Amani Taamalli** por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.



Quiero dar las gracias a mis amigos, los que siempre han estado en los buenos y no tan buenos momentos. En especial a **Silvia, Andrea y Torrano** por mantenerme conectada al mundo y no dejar que me convierta en una total ermitaña, por aguantar mi mal humor, mi fobia a romper el papel de regalo y otras tantas rarezas que les pago con contrabando de croquetas de mi madre.

A mis dos bioquímicas, esas compañeras de carrera que se convirtieron en grandes amigas y bote salvavidas cuando parecía que el mundo se hundía. A **Mayte**, por su fe ciega en que llegaré lejos, y a **Pilar**, por ser la risa y la evasión cuando más lo necesité.

A **Adrián**, mi novio, quien me impulsa para que siga creciendo, por compartir mi entusiasmo por cosas que le suenan a chino, por los viajes en fin de semana porque tenía “un par de horas” de cultivo, las cenas tardías porque el ensayo se ha alargado, las meriendas mientras escribía este trabajo y por mil detalles más que me transmiten su apoyo y amor.

A toda **mi familia** por los ánimos en los momentos de estrés y por transmitirme su orgullo por mis logros. Una mención especial a **mi madre**, mi apoyo incondicional que sufre y celebra conmigo cada acontecimiento de mi vida, y a mis hermanos, **Imanol y Agustín**, porque algo de cierto tiene que haber en eso de que he salido de provecho gracias a ellos.

Por último, quiero agradecer y dedicar este trabajo a los que ya no están. **Mi padre** que siempre me impulsó a seguir hacia delante a pesar de los obstáculos y a conseguir lo que quería confiando en que elegiría el camino correcto. Mis padrinos, **M<sup>a</sup> Agustina, Mercedes y Juan** que demostraron que la familia también se elige y llenaron mi infancia de recuerdos felices. A vosotros que fuisteis, sois y seréis mi ejemplo de lucha.

**Mi más profundo agradecimiento a todos.**



*"Just what you want to be*

*You could be in the end"*



The Moody Blues



# Índice

Índice .....	1
Abreviaturas.....	7
Índice de figuras .....	11
Índice de tablas .....	19
Índice de ecuaciones .....	21
Resumen .....	23
Abstract .....	25
1. Introducción .....	27
1.1. Cáncer.....	29
1.2. El cáncer de mama .....	34
1.2.1. Anatomía.....	34
1.2.2. Clasificación.....	35
1.2.3. Incidencia y mortalidad .....	37
1.2.4. Factores de riesgo .....	39
1.2.5. Diagnóstico.....	40
1.2.6. Subtipos moleculares y tratamientos.....	41
1.2.7. Metástasis .....	44
1.3. Dianas moleculares en el cáncer de mama .....	49
1.3.1. Ciclo celular .....	49

1.3.2.	Muerte celular.....	51
1.3.3.	Balance REDOX.....	55
1.3.4.	Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM).....	57
1.3.5.	ER y producción de estrógenos.....	58
1.3.6.	Sobreexpresión de HER2, Hsp90 y FASN.....	60
1.4.	Índice terapéutico.....	62
1.5.	Biodisponibilidad.....	63
1.6.	Aditividad, sinergia y antagonismo.....	65
1.7.	Compuestos naturales bioactivos.....	68
1.7.1.	Polifenoles: estructura y clasificación.....	70
1.8.	Uso de un extracto de hoja de olivo.....	71
2.	Hipótesis y Objetivos.....	77
3.	Metodología.....	81
3.1.	Líneas celulares y condiciones de mantenimiento.....	83
3.1.1.	MCF10A.....	83
3.1.2.	MCF7.....	84
3.1.3.	JIMT-1.....	84
3.1.4.	MDA-MB-231.....	85
3.1.5.	THV.....	85
3.1.6.	MDA-MB-231-BR.....	85
3.1.7.	Caco-2.....	86
3.2.	Preparación de los tratamientos.....	86



3.3.	Determinación del contenido fenólico.....	87
3.4.	Medida de la capacidad antioxidante .....	88
3.4.1.	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	88
3.4.2.	FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) .....	89
3.5.	Determinación de la viabilidad celular .....	90
3.5.1.	Ensayo MTT .....	90
3.5.2.	Cuantificación de núcleos .....	91
3.6.	Análisis estadístico de composición y actividad .....	92
3.7.	Cálculo del índice terapéutico .....	93
3.8.	Ensayos de proliferación, migración e invasión.....	93
3.8.1.	Ensayo de capacidad clonogénica .....	93
3.8.2.	Ensayo de migración celular: “Wound healing” .....	94
3.8.3.	Ensayo de invasión celular: “Wound healing” .....	94
3.9.	Análisis del ciclo celular .....	95
3.10.	Detección de apoptosis mediante Anexina-V.....	96
3.11.	Determinación de la integridad de la membrana plasmática .....	98
3.12.	Determinación de necroptosis y autofagia.....	99
3.13.	Medición del Potencial de Membrana Mitocondrial .....	100
3.13.1.	Muse Cell Analyzer .....	100
3.13.2.	Microscopía de fluorescencia.....	101
3.14.	Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) .....	102
3.15.	Absorción intestinal <i>in vitro</i> .....	103

3.15.1.	Obtención de muestras .....	103
3.15.2.	Análisis de muestras por HPLC.....	104
3.15.3.	Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ).....	105
3.16.	Absorción hematoencefálica derivada de la $P_{app}$ .....	106
3.17.	Estudio de la sinergia entre diosmetina, apigenina y luteolina.....	107
4.	Resultados.....	109
Capítulo I: Optimización de la capacidad antioxidante y antiproliferativa de un extracto de hoja de olivo .....		
		111
4.1.	Determinación del contenido fenólico.....	114
4.2.	Determinación de la capacidad antioxidante .....	115
4.3.	Determinación de la viabilidad en modelos celulares.....	116
4.4.	Búsqueda estadística de posibles candidatos responsables de las actividades de los extractos.....	119
Capítulo II: Estudio del mecanismo de acción de la mezcla de flavonas DAL511 en los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama .....		
		123
4.5.	Mecanismo de acción de la mezcla DAL511 en un modelo de cáncer de mama de subtipo luminal .....	125
4.5.1.	Determinación del efecto antiproliferativo .....	125
4.5.2.	Determinación del mecanismo de muerte celular.....	130
4.6.	Mecanismo de acción de la mezcla DAL511 en un modelo de cáncer de mama de subtipo HER2+.....	138
4.6.1.	Determinación del efecto antiproliferativo .....	138
4.6.2.	Determinación del mecanismo de muerte celular.....	143

4.7.	Mecanismo de acción de la mezcla DAL en un modelo de cáncer de mama de subtipo TNBC.....	148
4.7.1.	Determinación del efecto antiproliferativo .....	148
4.7.2.	Determinación del mecanismo de muerte celular .....	153
4.8.	Mecanismo de acción de la mezcla DAL en un modelo de metástasis cerebral procedente de cáncer de mama de subtipo TNBC.....	158
4.8.1.	Determinación del efecto antiproliferativo .....	158
4.8.2.	Determinación del mecanismo de muerte celular .....	163
Capítulo III: Absorción intestinal <i>in vitro</i> y estudio del transporte a través de la barrera hematoencefálica mediante un modelo matemático .....		169
4.9.	Determinación de los valores de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) .....	172
4.10.	Determinación de la absorción hematoencefálica derivada de la $P_{app}$ ..	175
Capítulo IV: Aditividad, sinergia y antagonismo entre la capacidad antiproliferativa de diosmetina, apigenina y luteolina en modelos celulares de cáncer de mama .....		177
4.11.	Combinaciones dobles .....	179
4.12.	Combinación triple.....	183
5.	Discusión .....	189
5.1.	Optimización de la capacidad antioxidante y antiproliferativa de un extracto de hoja de olivo .....	191
5.2.	La mezcla de flavonas DAL511 presenta un efecto antiproliferativo en modelos celulares de cáncer de mama .....	193
5.3.	La mezcla de flavonas DAL511 tiene efectos citotóxicos y/o citostáticos en todos los modelos celulares utilizados. ....	198
5.4.	Absorción intestinal y paso a través de la BHE .....	201

5.5. Aditividad, sinergia y antagonismo en la capacidad antiproliferativa de mezclas con diosmetina, apigenina y luteolina.....	204
6. Conclusiones.....	209
7. Bibliografía .....	219
8. Anexo .....	239



## Abreviaturas

<b>7-AAD</b>	7-ActinoAminomicina D
<b>A-L</b>	Apigenina-Luteolina
<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-bis 3-etilBenzoTiazolin-6-Sulfónico
<b>ADME</b>	Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción
<b>ADN</b>	Acido DesoxirriboNucleico
<b>AP</b>	Cámara Apical
<b>APC/C</b>	Complejo enzimático promotor de la anafase ( <i>del inglés Anaphase Promotor Complex</i> )
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato ( <i>del inglés Adenosin TriPhosphate</i> )
<b>BHE</b>	Barrera HematoEncefálica
<b>BL</b>	Cámara Basolateral
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclinas ( <i>del inglés Cyclin Dependent Kinase</i> )
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario ( <i>del inglés Carcinoembryonary Antigen</i> )
<b>CI</b>	Índice de combinación ( <i>del inglés Combinatory Index</i> )
<b>CNBs</b>	Compuestos Naturales Bioactivos
<b>DCIS</b>	Carcinoma ductal <i>in situ</i> ( <i>del inglés Ductal Carcinoma In Situ</i> )
<b>D-A</b>	Diosmetina-Apigenina
<b>D-L</b>	Diosmetina-Luteolina
<b>DAL511</b>	Diosmetina-Apigenina-Luteolina 5:1:1
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis Efectiva 50

<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal 50
<b>DMEM</b>	Medio Eagle con modificación Dulbecco ( <i>del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNMT</b>	ADN metiltransferasa ( <i>del inglés DNA methyltransferase</i> )
<b>EBV</b>	Virus de Epstein-Barr ( <i>del inglés Epstein-Barr Virus</i> )
<b>ER</b>	Receptor de Estrógeno
<b>Er</b>	Efflux ratio
<b>Fa</b>	Fracción afectada
<b>FASN</b>	Sintasa de ácidos grasos ( <i>del inglés Fatty Acid Synthase</i> )
<b>FICI</b>	Índice fraccionario de concentración inhibitoria ( <i>del inglés Fractionary</i>
<b>FRAP</b>	Poder antioxidante de la reducción del ion férrico ( <i>del inglés Ferric ion Reducing Antioxidant Power</i> )
<b>FS</b>	Fosfatidilserina
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	2',7'-Diclorofluoresceína Diacetato
<b>HBSS</b>	Solución salina equilibrada de Hank ( <i>del inglés Hank's Balanced Salt Solution</i> )
<b>HDAC</b>	Histona Deacetilasa
<b>HER2</b>	Receptor epidérmico humano de tipo 2 ( <i>del inglés Human Epidermic Receptor type 2</i> )
<b>HHV-8</b>	Herpervirus humano tipo 8 ( <i>del inglés Human HerpesVirus type 8</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>del inglés High Performance Liquid Chromatography</i> )

<b>HPV</b>	Virus del papiloma humano ( <i>del inglés Human Papilloma Virus</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria del 50%
<b>IT</b>	Índice Terapéutico
<b>LCIS</b>	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> ( <i>del inglés Lobulillar Carcinoma in situ</i> )
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MLG</b>	Modelo Lineal Generalizado
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NTI</b>	Índice terapéutico estrecho ( <i>del inglés Narrow Therapeutic Index</i> )
<b>P/S</b>	Penicilina/Estreptomicina
<b>P<sub>app</sub></b>	Permeabilidad aparente
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>del inglés Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PEG<sub>400</sub></b>	Polietilenglicol 400
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3 quinasa ( <i>del inglés Phosphoinositol-3 Kinase</i> )
<b>PMM</b>	Potencial de Membrana Mitocondrial
<b>PR</b>	Receptor de Progesterona
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>del inglés Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SCL</b>	Sonda Catiónica Lipofílica
<b>SERM</b>	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos ( <i>del inglés Selective Estrogen Receptors Modulators</i> )
<b>SET</b>	Transferencia de un solo electrón ( <i>del inglés Single Electron Transference</i> )

<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente a trolox ( <i>del inglés Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> )
<b>TEER</b>	Resistencia eléctrica transepitelial ( <i>del inglés TransEpithelial Electric Resistance</i> )
<b>TNBC</b>	Cáncer de mama triple negativo ( <i>del inglés Triple Negative Breast Cancer</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>del inglés Tumoral necrosis factor alpha</i> )
<b>TPTZ</b>	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina
<b>VHB</b>	Virus de la hepatitis B





## Índice de figuras

Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.....	29
Figura 2. Principales características de las células tumorales .....	30
Figura 3. Porcentajes de incidencia (A) y mortalidad (B) según continente.....	31
Figura 4. Esquema de los tipos de cáncer según el tejido en que se producen .....	33
Figura 5. Esquema anatómico de la glándula mamaria.....	34
Figura 6. Localización de los principales tumores mamarios.....	36
Figura 7 Porcentajes de incidencia de los tipos mayoritarios de cáncer para mujeres, hombres y ambos sexos – Fuente: GLOBOCAN 2018.....	38
Figura 8. Procesos de formación de la metástasis cerebral.....	48
Figura 9. El ciclo celular y sus puntos de control .....	50
Figura 10. Mecanismo de necrosis/necroptosis .....	52
Figura 11. Mecanismo de apoptosis.....	53
Figura 12. Mecanismo de autofagia .....	54
Figura 13. Estado REDOX según niveles de ROS .....	55
Figura 14. Estructura de la mitocondria .....	57
Figura 15. Dianas terapéuticas frente a la actividad estrogénica .....	59
Figura 16. Dianas terapéuticas frente a la actividad de HER2 .....	61
Figura 17. Índice terapéutico y ventana terapéutica .....	63
Figura 18. Proceso ADME .....	63
Figura 19. Representación esquemática del método de isoblograma.....	66

Figura 20. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario del carbono .....	69
Figura 21. Principales grupos de polifenoles .....	71
Figura 22. Ciclo vegetativo y reproductor del olivo .....	72
Figura 23. Detalle de la planta, flor, fruto y semilla de <i>Olea europaea</i> .....	73
Figura 24 Cromatogramas de iones extraídos (EIC) con estructuras moleculares de los metabolitos identificados en el citoplasma de células JIMT-1 tratadas con extracto de hoja de oliva SFE durante 72 h.....	74
Figura 25. Estructura general de los flavonoides y estructura de la diosmetina, apigenina y luteolina .....	75
Figura 26. Micrografía de la línea MCF10A.....	83
Figura 27. Micrografía de la línea MCF.....	84
Figura 28. Micrografía de la línea JIMT-1 .....	84
Figura 29. Micrografía de la línea MDA-MB-231.....	85
Figura 30. Micrografía de la línea Caco-2 .....	86
Figura 31. Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con el ácido gálico .....	87
Figura 32 Reacción del reactivo ABTS .....	88
Figura 33. Reacción del reactivo TPTZ.....	89
Figura 34. Reacción del reactivo MTT .....	90
Figura 35. SPECTROstar Omega .....	91
Figura 36. Acción de la sonda Hoechst 33342 .....	91
Figura 37. Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode .....	92
Figura 38. Ensayo de colonias.....	93

Figura 39. Ensayo de migración celular “Wound healing” .....	94
Figura 40. Histogramas del contenido de ADN .....	95
Figura 41. Muse Cell Analyzer.....	96
Figura 42. Ejemplo de distribución de la población en los cuadrantes del ensayo Anexina-V.....	97
Figura 43. Reacción colorimétrica del ensayo de LDH .....	98
Figura 44. Ejemplo de distribución de la población en los cuadrantes del ensayo de mitopotencial.....	100
Figura 45. Reacción de la sonda H <sub>2</sub> DCF-DA .....	102
Figura 46. Esquema del modelo de absorción formado por el inserto de policarbonato y la monocapa celular de Caco-2 .....	103
Figura 47. Representación de la medida del TEER.....	104
Figura 48. Esquema de placa para los ensayos de sinergia con combinaciones dobles (superior), y triples (inferior) .....	108
Figura 49. Resultados del contenido fenólico en función de la estación de recogida y de la temperatura de secado.....	114
Figura 50. Resultados de la capacidad antioxidante en función de la estación de recogida y de la temperatura de secado. ....	115
Figura 51. Efecto del extracto C5A en la línea de cáncer de mama luminal MCF7 y HER2+ JIMT-1. ....	116
Figura 52. Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama luminal MCF7 y la línea control no tumoral MCF10A. ....	126
Figura 53. Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica en la línea de cáncer de mama luminal MCF7.....	127

Figura 54. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing en la línea de cáncer de mama luminal MCF7.....	128
Figura 55. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel en la línea de cáncer de mama luminal MCF7 .....	129
Figura 56. Efecto de la mezcla DAL511 en el ciclo celular en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 .....	130
Figura 57. Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7.....	131
Figura 58. Efecto sobre la liberación de la LDH de la mezcla DAL511 en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7.....	132
Figura 60. Efecto de la mezcla DAL511 en la viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 en presencia del inhibidor de la autofagia cloroquina .....	133
Figura 59. Efecto de la mezcla DAL511 en la viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 en presencia del inhibidor de la necroptosis necrostatina-1.....	133
Figura 61. Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. ....	135
Figura 62. Efecto de la mezcla DAL511 en el PMM en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7.....	136
Figura 63. Efecto de la mezcla DAL511 en el PMM en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 .....	136
Figura 64. Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama luminal MCF7.....	137

Figura 65. Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 y la línea control no tumoral MCF10A .....	139
Figura 66. Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica de la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 .....	140
Figura 67. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1.....	141
Figura 68. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 .....	142
Figura 69. Efecto de la mezcla DAL511 en el ciclo celular la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 .....	143
Figura 70. Determinación de apoptosis mediante Anexina-V la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 .....	144
Figura 71. Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 .....	145
Figura 72. Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 .....	146
Figura 73. Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1.....	147
Figura 74. Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231 y la línea control no tumoral MCF10A .....	149
Figura 75. Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. ....	150
Figura 76. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231 .....	151

Figura 77. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231.....	152
Figura 78. Efecto de la mezcla DAL511 en el ciclo la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. ....	153
Figura 79. Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231 .....	154
Figura 80. Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231 .....	155
Figura 81. Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. ....	156
Figura 82. Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231 .....	157
Figura 83. Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR y la línea control sana THV .....	159
Figura 84. Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. ....	160
Figura 85. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR.....	161
Figura 86. Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR .....	162
Figura 87. Efecto de la mezcla DAL511 sobre el ciclo celular la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR .....	163

Figura 88. Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR.....	164
Figura 89. Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR.....	165
Figura 90. Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR.....	166
Figura 91. Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR.....	167
Figura 92. Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla DAL511 .....	173
Figura 93. Valores de $P_{app}$ expresados como $\text{cm/s } 10^{-6}$ .....	174
Figura 94. Valores Efflux ratio .....	174
Figura 95. Valores de $P_{active}$ expresados como $\text{cm/s } 10^{-6}$ .....	175
Figura 96. Isobogramas para las combinaciones dobles en las líneas celulares MCF7 y JIMT-1. ....	182
Figura 97. Isobograma para la combinación D-A-L en la línea celular MCF7.....	186
Figura 98. Isobograma para la combinación D-A-L en la línea celular JIMT-1 .....	187
Figura 99. Resultados de los ensayos de migración e invasión para todos los modelos celulares.....	197

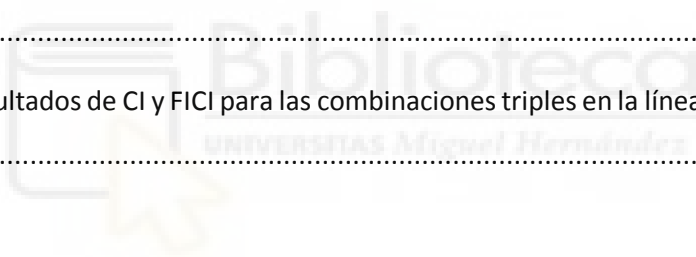




## Índice de tablas

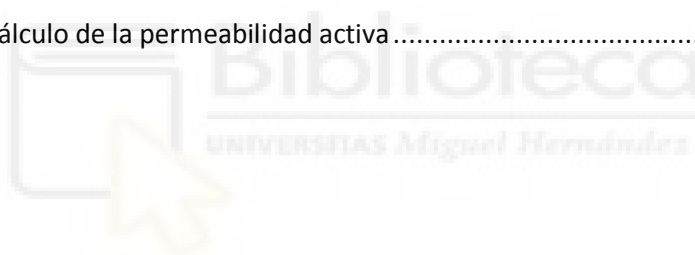
Tabla 1. Tasas de incidencia y mortalidad cada 100.000 habitantes estandarizadas por edad (ASR) .....	32
Tabla 2. Estadificación .....	37
Tabla 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama .....	42
Tabla 4. Preferencia trófica para el desarrollo de metástasis según los diferentes tipos de cáncer .....	46
Tabla 5. Condiciones de extracción y resultados de FOLIN, TEAC, FRAP y MTT para los 30 extractos de hoja de olivo.....	118
Tabla 6. Resumen del modelo MLG para la actividad antioxidante TEAC.....	119
Tabla 7. Resumen del modelo MLG para la actividad antioxidante FRAP.....	120
Tabla 8. Resumen del modelo MLG para la actividad antiproliferativa en JIMT-1 ....	120
Tabla 9. Composición de los extractos de hoja de olivo según la estación de recogida y la temperatura de secado ( $\mu\text{g/g}$ ) .....	121
Tabla 10. Valores de $\text{IC}_{50}$ tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en MCF7.....	126
Tabla 11. Valores de $\text{IC}_{50}$ tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en JIMT-1 .....	138
Tabla 12. Valores de $\text{IC}_{50}$ tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en MDA-MB-231.....	148
Tabla 13. Valores de $\text{IC}_{50}$ tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en MDA-MB-231-BR .....	158
Tabla 14. Resumen de resultados de los ensayos celulares para DAL511 en modelos de cáncer de mama.....	168

Tabla 15. Parámetros analíticos de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación de luteolina, apigenina y diosmetina.....	172
Tabla 16. Valores de $P_{app}$ de los compuestos (cm/s) de la mezcla DAL511 en ambas direcciones estudiadas. ....	174
Tabla 17. Valores de Efflux ratio (Er) calculado a partir de las $P_{app}$ .....	174
Tabla 18. Valores de $P_{active}$ para los compuestos de la mezcla DAL511.....	175
Tabla 19. Resultados de CI y FICI para las combinaciones dobles en la línea celular MCF7.....	180
Tabla 20. Resultados de CI y FICI para las combinaciones dobles en la línea celular JIMT-1.....	181
Tabla 21. Resultados de CI y FICI para las combinaciones triples en la línea celular MCF7 .....	184
Tabla 22. Resultados de CI y FICI para las combinaciones triples en la línea celular JIMT-1.....	185



## Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del Índice Terapéutico.....	62
Ecuación 2. Aproximación para el cálculo del Índice Terapéutico a partir de datos <i>in vitro</i> .....	62
Ecuación 3. Fórmula para el cálculo del Índice Fraccionario de Concentración Inhibitoria .....	65
Ecuación 4. Fórmula para el cálculo del Índice de Combinación .....	66
Ecuación 5. Cálculo de la citotoxicidad mediante cuantificación de LDH .....	99
Ecuación 6. Cálculo del coeficiente de la permeabilidad aparente .....	105
Ecuación 7. Cálculo del Efflux ratio .....	106
Ecuación 8. Cálculo de la permeabilidad activa .....	106





## Resumen

En las últimas décadas se han logrado nuevos avances en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer utilizando compuestos naturales, entre los cuales los polifenoles han surgido como moléculas prometedoras. Pueden actuar sobre varios objetivos moleculares debido a su comportamiento promiscuo, presentando varios efectos fisiológicos, algunos de los cuales confieren actividad antitumoral.

El objetivo del presente trabajo ha sido optimizar las condiciones de extracción de un extracto de hoja de olivo con capacidad antitumoral en modelos celulares de cáncer de mama ya demostrada y determinar la capacidad antiproliferativa, así como el mecanismo de acción, de los principales compuestos activos de dicho extracto, la diosmetina, la apigenina y la luteolina.

Para estudiar el mecanismo de acción por el cual estos compuestos inhiben la proliferación celular se llevaron a cabo ensayos de viabilidad y citotoxicidad, así como ensayos relacionados con la viabilidad mitocondrial y el estrés oxidativo. Además, se ha analizado la permeabilidad intestinal de los compuestos mediante el uso de monocapas de células intestinales Caco-2 como modelo de epitelio intestinal y a partir de sus estos resultados se ha estimado el potencial de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Por último, se estudiaron las interacciones sinérgicas para la capacidad antiproliferativa entre los tres compuestos en combinaciones dobles y triples.

Los resultados obtenidos demuestran que la combinación de los compuestos diosmetina, apigenina y luteolina posee un efecto antiproliferativo en modelos celulares de los tres subtipos moleculares, luminal, HER2+ y triple negativo (TNBC), así como en un modelo celular metastásico de cerebro, siendo además este efecto selectivo de las células tumorales puesto que es muy inferior en un modelo celular de tejido no tumoral.

El mecanismo de muerte principal para las líneas celulares de cáncer de mama luminal y TNBC fue la apoptosis con daño mitocondrial y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, observándose de manera secundaria un efecto citostático. Por el contrario, en la línea celular de cáncer de mama HER2+ se observó principalmente un efecto citostático y secundariamente un efecto apoptótico con un leve daño mitocondrial.

Además, se determinó que los tres compuestos presentan una permeabilidad intestinal moderada y que son buenos candidatos para atravesar la barrera hematoencefálica.

En cuanto a los efectos sinérgicos para la capacidad antiproliferativa, los compuestos mostraron interacciones dependientes de la ratio, es decir, que dependiendo de la ratio pueden presentar tanto sinergia, como aditividad o antagonismo.

Los resultados obtenidos justifican la utilización de la combinación de diosmetina, apigenina y luteolina en nuevos ensayos que profundicen en su mecanismo de acción, así como estudios *in vivo* que confirmen sus capacidades antitumorales en modelos animales cáncer de mama, además de su permeabilidad intestinal y hematoencefálica.

## Abstract

In recent decades, new advances have been made in the discovery of anti-cancer drugs using natural compounds, and polyphenols have emerged as promising molecules. They can act on several molecular targets due to their promiscuous behavior, presenting several physiological effects, some of which confer antitumor activity.

The objective of this work has been to optimize the extraction conditions of an olive leaf extract that has shown antitumor capacity in breast cancer cell models and determine the antiproliferative capacity, as well as the mechanism of action of its main active compounds, diosmetin, apigenin and luteolin.

To study the mechanism of action by which these compounds inhibit cell proliferation, viability and cytotoxicity tests were carried out, as well as tests related to mitochondrial viability and oxidative stress. In addition, the intestinal permeability of the compounds has been analyzed using Caco-2 intestinal cell monolayers as a model of intestinal epithelium and based on these results, the potential to cross the blood-brain barrier has been estimated. Finally, synergistic interactions for the antiproliferative capacity between the three compounds in double and triple combinations were studied.

The results show that the combination of diosmetin, apigenin and luteolin exhibit antiproliferative effect in cellular models of the three molecular subtypes, luminal, HER2+ and triple negative (TNBC), as well as in a brain metastatic cell model. This was a selective effect on tumor cells since the combination showed a weaker effect on a non-cancer breast cell model.

The main death mechanism for luminal and TNBC cell lines was apoptosis with mitochondrial damage and increased production of reactive oxygen species, a cytostatic effect being observed secondarily.

Nevertheless, for the cancer cell line HER2 + breast, the main effect was cytostatic and secondarily an apoptotic effect with a slight mitochondrial damage.

In addition, intestinal permeability, it was determined that the three compounds have a moderate permeability and that they are good candidates to cross the blood brain barrier.

Regarding the synergistic effects for the antiproliferative capacity, the compounds showed interactions depending on the ratio, that is, depending on the ratio, they can present synergy, additivity or antagonism.

The results obtained justify the use of the combination of diosmetin, apigenin and luteolin in new trials that deepen its mechanism of action, as well as *in vivo* studies that confirm its antitumor abilities in animal models breast cancer, in addition to its intestinal and blood-brain permeability.







Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Alemán

## 1. Introducción



## 1.1.Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se origina cuando las células normales del organismo sufren una serie de mutaciones que tienen como consecuencia un crecimiento anormal y descontrolado, produciéndose la formación de agrupaciones celulares en masas tumorales. El **crecimiento descontrolado** se ve acompañado por la **angiogénesis**, es decir, por la generación de nuevos vasos sanguíneos (**Figura 1**). Algunas de las células tumorales pueden llegar a otros órganos a través de la invasión de tejidos adyacentes, **extensión local**, de la entrada circulación sanguínea, **extravasación**, o mediante el sistema linfático, **infiltración linfática**, y dar lugar a tumores secundarios, o lo que es lo mismo, generar **metástasis**<sup>1</sup>.

Las células cancerígenas presentan múltiples alteraciones tanto en el número como en la estructura de sus genes y cromosomas.

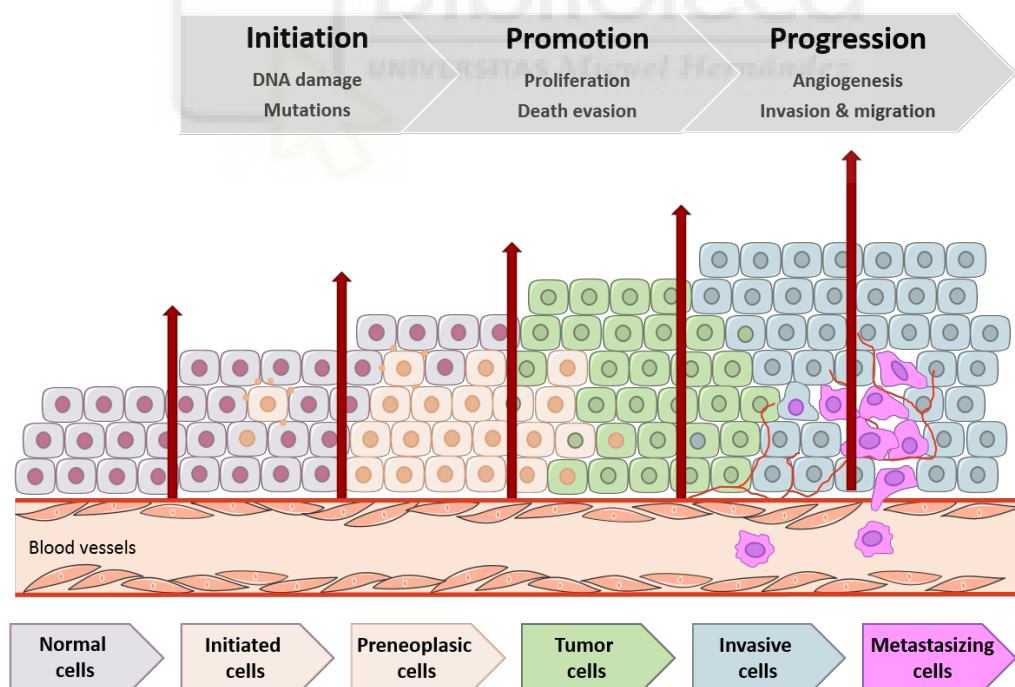
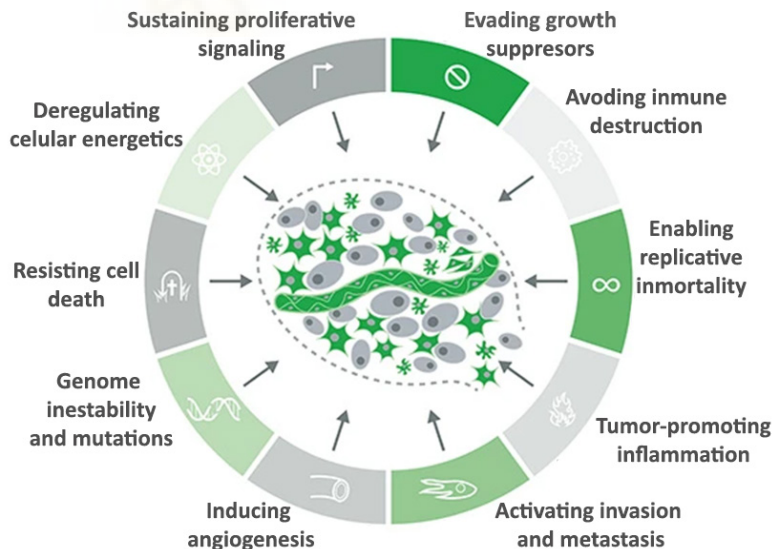


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis

La mayoría de las alteraciones genéticas que presentan las células cancerosas ocurren en células somáticas, aunque en algunos tipos de cánceres las alteraciones pueden afectar a células germinales o ser alteraciones epigenéticas.

Las diferentes mutaciones que promueven la aparición de células cancerígenas les otorgan ciertas características que les permiten crecer de manera descontrolada y formar tumores<sup>2</sup>, algunas de estas características son las siguientes (**Figura 2**):

- Producción de **factores de crecimiento**.
- **Insensibilidad** a las señales de **inhibición de crecimiento**.
- **Evasión del sistema inmune**.
- Capacidad de **replicación sin límite**.
- Proceso de **inflamación**.
- Capacidad de invadir y producir **metástasis**.
- Inducción de **angiogénesis**.
- Inestabilidad genómica y **mutaciones**.
- **Evasión** de la apoptosis y otros mecanismos de **muerte celular**.
- **Reprogramación metabólica**.

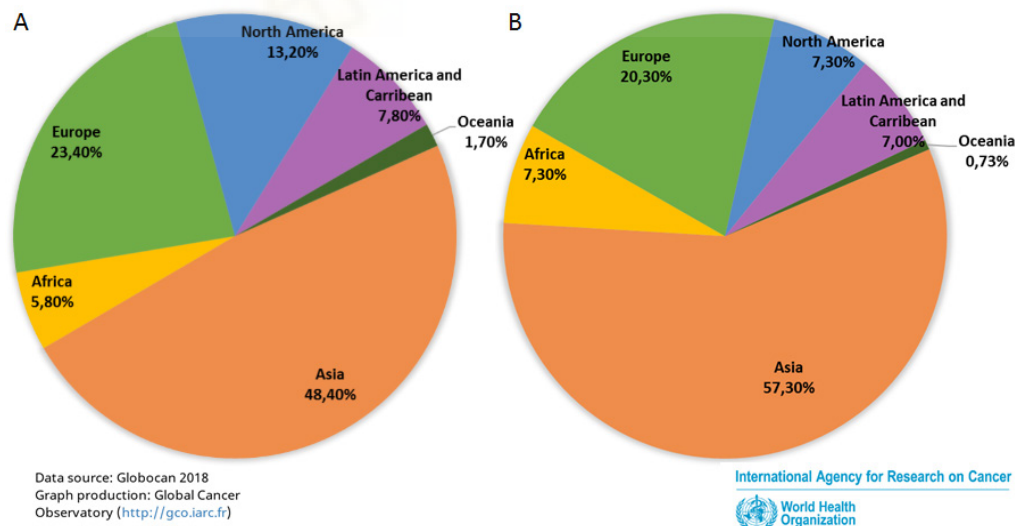


**Figura 2.** Principales características de las células tumorales – Fuente: Abcam

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud en la población, siendo una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial. En 2018 se diagnosticaron 18 millones de nuevos casos, el 1.6% de ellos en España, y hubo 9.5 millones de muertes relacionadas con el cáncer, el 1% de ellas en España<sup>3</sup>.

Los continentes menos desarrollados, África, América latina y Asia representan más del 60% de la incidencia y entorno al 70% de la mortalidad frente al 30% y 40% que suman Europa y América del norte respectivamente (**Figura 3**).

Se estima que en los próximos 20 años se producirán un 60% más de nuevos casos y que el número de muertes ascenderá un 70% respecto a la actualidad. Dicho incremento sería consecuencia del envejecimiento de la población debido al aumento en la esperanza de vida, el aumento de la población y los hábitos de vida perjudiciales como el sedentarismo, la elevada tasa de obesidad, el tabaquismo o el alcoholismo, así como las infecciones por virus oncogénicos como el de la hepatitis B (VHB) y el hepatocarcinoma, el Epstein-Barr (EBV) y el linfoma de Burkitt, el del papiloma humano (HPV) y el cáncer uterino, cervical y de próstata o una de las especies de herpes virus (HHV-8) y el sarcoma de Kaposi.



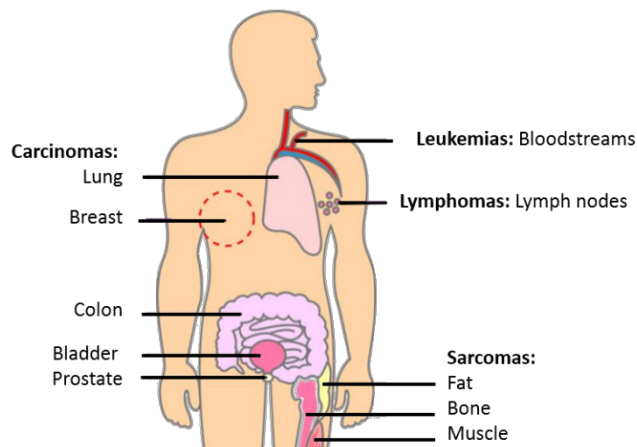
**Figura 3.** Porcentajes de incidencia (A) y mortalidad (B) según continente – Fuente: GLOBOCAN 2018

Continente/Zona		Incidencia			Mortalidad		
		Hombres	Mujeres	Ambos	Hombres	Mujeres	Ambos
África	Este	112,4	150,7	131,9	87,0	107,6	97,4
	Centro	101,8	109,2	104,2	79,5	80,9	79,1
	Norte	138,9	137,3	137,2	102,1	76,9	88,5
	Sur	230,5	196,1	204,2	142,4	98,3	113,1
	Oeste	95,6	122,0	108,3	72,1	83,6	77,3
América	Caribe	213,1	182,9	196,2	117,4	89,5	101,7
	Centro	139,3	149,7	144,0	67,4	64,2	65,3
	Norte	387,6	322,1	350,2	104,2	80,7	91,2
	Sur	220,0	195,2	204,3	107,3	81,1	91,9
Asia	Este	238,4	192,0	213,2	159,6	89,7	123,2
	Sur-Centro	97,5	95,9	96,3	70,9	60,6	65,6
	Sur-Este	156,1	142,5	147,2	113,8	79,7	94,7
	Oeste	190,1	154,6	168,2	120,5	74,3	95,1
Europa	Este-Centro	280,1	216,5	238,3	171,0	92,0	123,1
	Norte	344,6	295,0	316,2	118,4	88,7	101,7
	Sur	319,5	247,0	278,4	131,5	76,2	100,9
	Oeste	363,5	195,2	323,4	130,0	84,4	105,0
Oceanía	Australia- Nueva Zelanda	571,2	362,2	463,1	109,8	120,7	92,9
	Melanesia	197,3	203,6	197,3	133,3	120,7	124,4
	Micronesia	204,6	204,3	80,3	145,6	90,6	115,8
	Polinesia	241,7	160,3	220,3	142,2	99,0	118,3

**Tabla 1.** Tasas de incidencia y mortalidad cada 100.000 habitantes estandarizadas por edad (ASR) – Fuente: GLOBOCAN 2018

Los tipos de cáncer se pueden clasificar según el órgano en que se producen (colon, pulmón, mama, etc.) o por el tejido que les dio origen (**Figura 4**):

- **Carcinomas:** son cánceres con origen en las células epiteliales que conforman el tejido que tapiza la superficie de órganos, glándulas y estructuras corporales. Representan más del 80% del total de cánceres, incluyendo los tipos más comunes de cáncer como son el de pulmón, mama, colon o próstata.
- **Sarcomas:** son cánceres que se forman a partir del tejido conectivo (muscular, óseo, cartilaginoso y graso) siendo más frecuentes los de tipo óseo. Son poco comunes, representan solo el 1% del total, y aunque pueden aparecer a cualquier edad tienen mayor incidencia en la infancia y la adolescencia.
- **Leucemias:** son cánceres que se originan en las células de la serie linfocítica y de la serie mieloide producidas por la médula ósea y que conforman el grueso de las células sanguíneas. Son el tipo de cáncer infantil más frecuente.
- **Linfomas:** se desarrollan a partir de células de la serie linfocítica, concretamente los linfocitos, y se localizan generalmente en el interior de ganglios y órganos linfáticos, aunque también pueden verse afectados el hígado y el bazo. El criterio para diferenciar un linfoma de una leucemia de linfocitos es que la cantidad de linfocitos cancerosos, linfoblastos, en la médula sea inferior al 20%.



**Figura 4.** Esquema de los tipos de cáncer según el tejido en que se producen

## 1.2.El cáncer de mama

### 1.2.1.Anatomía

Las glándulas mamarias son los órganos encargados de la producción de leche y se encuentran ubicados en el tórax. La mama está constituida por múltiples **lóbulos** y lobulillos, en los cuales se produce la leche, y estos están unidos por una serie de tubos denominados **ductos** o conductos galactóforos que conducen la leche hacia el pezón. Además, está rodeada de **tejido graso** que proporciona consistencia y volumen a la mama (**Figura 5**). El tejido mamario también contiene vasos sanguíneos, cuya función es proporcionar sangre a la glándula y vasos linfáticos, que confluyen en pequeñas formaciones redondeadas denominadas **ganglios linfáticos** siendo los más cercanos a la mama los que se encuentran en la axila, a ambos lados del esternón y en la zona supraclavicular.

Desde el nacimiento hasta la edad adulta, las mamas se encuentran en constante cambio ya que es un tejido que depende del suministro de hormonas para su crecimiento, es decir, es un **tejido hormonodependiente**.

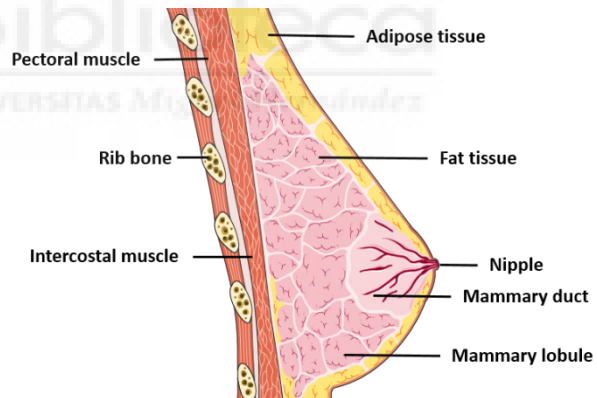


Figura 5. Esquema anatómico de la glándula mamaria

Bajo el efecto de las hormonas femeninas (estrógenos y progesterona), las mamas crecen durante la pubertad y se ven influenciadas en la edad reproductiva por los ciclos menstruales. En la menopausia, el descenso hormonal provoca una sustitución del tejido glandular por tejido adiposo.



Teniendo en cuenta la anatomía mamaria, los tumores de mama pueden diseminarse por:

- **Crecimiento local:** el cáncer de mama crece por invasión directa, infiltrando otras estructuras vecinas como la pared torácica (músculos y huesos) y la piel.
- **Diseminación linfática:** la red de vasos linfáticos de la mama permite el drenaje linfático hacia los ganglios. Los situados en la axila suelen ser los más afectados, seguidos de los situados en la arteria mamaria interna y los supraclaviculares.
- **Diseminación hematológica:** se realiza a través de los vasos sanguíneos preferentemente hacia los huesos, pulmón, hígado, cerebro y piel.

### 1.2.2. Clasificación

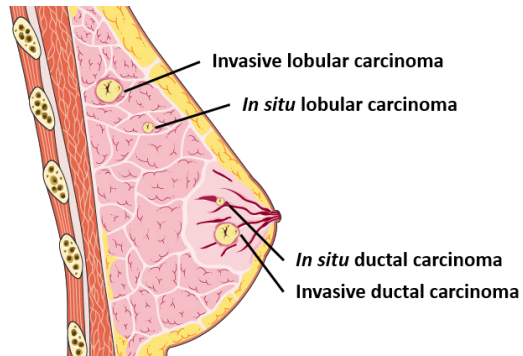
El cáncer de mama, puesto que se origina en el tejido que compone la glándula, se clasifica como un adenocarcinoma, aunque se suele denominar carcinoma. Este se puede clasificar como (**Figura 6**):

- **Carcinoma *in situ*:** tumores originados en el interior del conducto mamario que no se infiltran en el tejido adyacente, es decir, quedan contenidos por la membrana basal. Puede ser:
  - ◆ **DCIS** (del inglés *Ductal carcinoma in situ*): suelen diagnosticarse en pacientes asintomáticas debido a su hallazgo en mamografías de rutina preventiva cuando se observan calcificaciones en los ductos.
  - ◆ **LCIS** (del inglés *Lobulillar carcinoma in situ*): no suele considerarse esta neoplasia como cáncer debido a que no suelen evolucionar a un carcinoma invasivo pese a no ser tratados. Sin embargo, aumentan el riesgo de padecer otro carcinoma invasivo en cualquiera de las mamas.

- **Carcinoma invasivo o infiltrante:** tumores que han crecido e invadido el tejido circundante. Principalmente existen dos tipos de cáncer de mama invasivo:

- ◆ **Carcinomas ductales:**

se originan en las células que revisten los conductos galactóforos y traspasan la membrana basal de los ductos. Es el **tipo más frecuente** cerca del **80%**



**Figura 6.** Localización de los principales tumores mamarios

de los carcinomas invasivos en mama son ductales.

- ◆ **Carcinomas lobulillares:** se originan en las células de los lobulillos mamarios, donde se produce la leche, e invaden la pared de dichos lobulillos. Su incidencia es mucho menor que los carcinomas ductales representando solo el 10% de carcinomas mamarios

Por otro lado, la clasificación general de los tumores se lleva a cabo con el sistema de estadificación TNM (**Tabla 2**), que se usa para describir tanto la cantidad de tejido canceroso como su diseminación<sup>4</sup>.

- **Tumor primario (T):** describe el **tamaño** del tumor y la diseminación cercana.
  - ◆ TX: no puede medirse un tumor primario.
  - ◆ T0: no puede encontrarse un tumor primario.
  - ◆ Tis: carcinoma *in situ*.
  - ◆ T1, T2, T3, T4: se refiere al tamaño y/o extensión del tumor principal. Las T pueden subdividirse para proveer más detalle, como T3a y T3b.

- **Ganglios linfáticos regionales (N):** describe la **diseminación** del cáncer hasta los ganglios linfáticos cercanos.

- ◆ NX: no puede medirse el cáncer en los ganglios linfáticos cercanos.
- ◆ N0: no hay cáncer en los ganglios linfáticos cercanos.
- ◆ N1, N2, N3: se refiere al número y ubicación de los ganglios afectados.

- **Metástasis distante (M):** describe las metástasis.

- ◆ MX: no puede medirse la metástasis.
- ◆ M0: el cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
- ◆ M1: el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Estadio	TNM
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio I	T1 N0 M0
Estadio II A	T0 N1 M0
	T1 N1 M0
	T2 N0 M0
Estadio II B	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
Estadio III A	T0 N2 M0
	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
	T3 N2 M0
Estadio III B	T4 N0 M0
	T4 N1 M0
	T4 N2 M0
Estadio III C	Cualquier T N3 M0
Estadio IV	Cualquier T y N M1

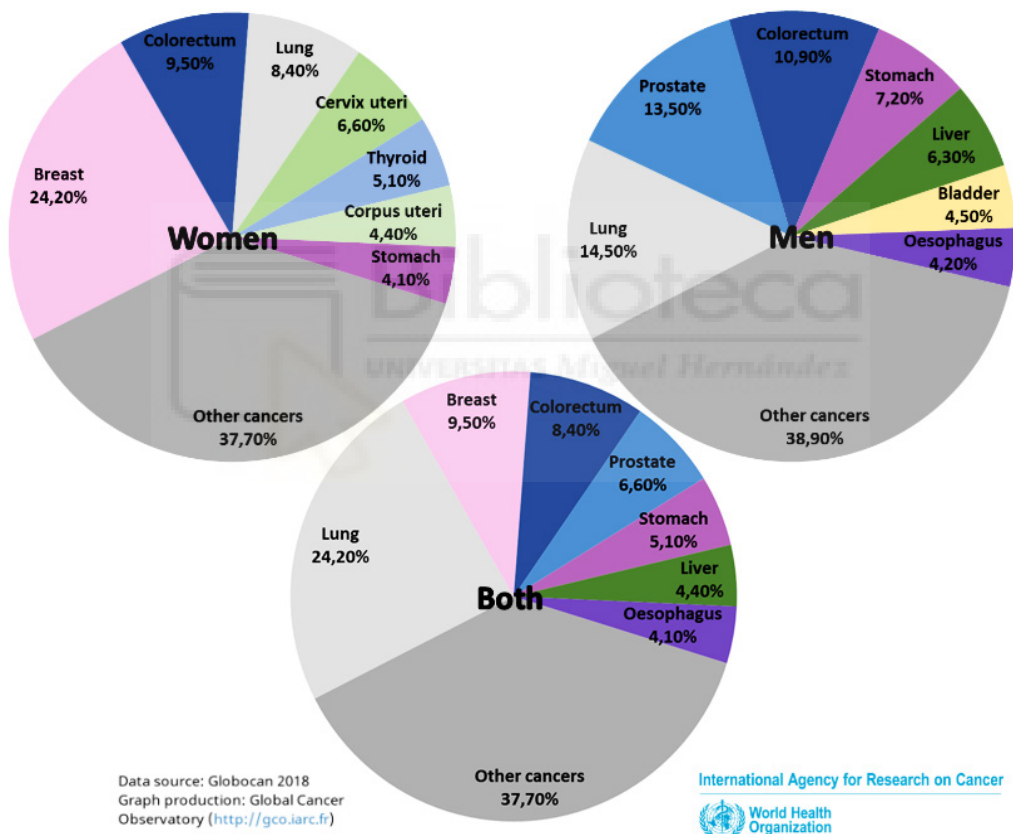
**Tabla 2.** Estadificación

### 1.2.3. Incidencia y mortalidad

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales, **2 de cada 8 mujeres** tendrá un tumor mamario a lo largo de su vida. Si se tienen en cuenta ambos sexos, solo el cáncer de pulmón presenta una mayor incidencia a nivel mundial mientras que en España, aun con esa consideración, sigue siendo el más común (**Figura 7**). Al año se diagnostican en el mundo 2 millones de nuevos casos, cerca de 33,000 de ellos en España<sup>3</sup>. Se calcula una tasa anual de mortalidad mundial cercana a las 627.000 muertes, más de 6.000 de ellas en España, y representa en torno al 10% del total de tumores a nivel mundial.

La mayor incidencia se corresponde con las zonas más desarrolladas como Australia, Europa o América del Norte mientras que la mortalidad es mayor en las zonas menos desarrolladas como Melanesia o Polinesia, siendo una excepción América del norte que ocupa el tercer lugar con las tasas de mortalidad más elevadas.

La diferencia entre la elevada incidencia y baja mortalidad en las zonas desarrolladas se debe a los avances en el diagnóstico precoz gracias a los cribados preventivos, como por ejemplo la mamografía bianual a mujeres a partir de los 40 años en España, así como a los nuevos tratamientos específicos alternativos a la quimioterapia clásica.



**Figura 7** Porcentajes de incidencia de los tipos mayoritarios de cáncer para mujeres, hombres y ambos sexos – Fuente: GLOBOCAN 2018

### 1.2.4. Factores de riesgo

Los factores que aumentan las posibilidades de desarrollar tumores mamarios son<sup>5</sup>:

- **El sexo:** la prevalencia en mujeres es cien veces mayor que en hombres debido a que es un órgano subdesarrollado en los hombres y a la ausencia de hormonas femeninas.
- **La edad:** el riesgo crece con la edad, ocurriendo el 77% de los casos pasados los 50 años.
- **La raza:** la raza caucásica presenta mayor prevalencia que la asiática o la africana y, aunque se desconocen las causas, esta diferencia se suele asociar con el estilo de vida.
- **La herencia genética:** el riesgo de tener un cáncer de mama es 1,8 veces superior si se tiene un familiar de primer grado con cáncer de mama u ovario. Si el tumor del familiar apareció a una edad temprana, antes de los 40 años, el riesgo se incrementa en 5,7 veces. Estudios recientes muestran que alrededor del 5 al 10% de los cánceres de mama son hereditarios debido a mutaciones genéticas. Los genes más conocidos son **BRCA 1 y BRCA 2**, que aumentan en un 80% las posibilidades de desarrollar cáncer de mama, y a una edad más joven. Otros genes involucrados son p53, ATM, PTEN, MLH1, MLH2 y CHEK-2<sup>6</sup>. Recientemente se ha puesto en práctica como medida preventiva la mastectomía en mujeres con antecedentes familiares que dan positivo para mutaciones en dichos genes.
- **Los factores hormonales:** la menarquia temprana (previa a los 12 años) y la menopausia tardía (después de los 55 años) aumentan el riesgo y podría deberse a una exposición más prolongada al estrógeno y la progesterona. La edad tardía (después de los 35 años) del primer embarazo también aumenta las posibilidades.

### 1.2.5. Diagnóstico

El diagnóstico se suele llevar a cabo más comúnmente en las revisiones habituales con el ginecólogo en pacientes asintomáticos o cuando la paciente acude a su médico de cabecera porque presenta síntomas. Primero se revisa la historia clínica y familiar y se realiza una exploración física para detectar posibles cambios en la consistencia de la mama, la presencia de nódulos y ganglios linfáticos en la axila o las fosas supraclaviculares y valorar el estado de la piel y del pezón.

Si existe sospecha de cáncer de mama se completa el diagnóstico con otras pruebas:

- **Análisis de sangre y orina:** realización de un hemograma, bioquímica renal y hepática y determinación de iones, además de la búsqueda de marcadores tumorales específicos para el cáncer de mama, el antígeno carcino-embriionario (CEA) y el CA 15-3.
- **Mamografía:** consiste en la realización de una radiografía especial de las mamas con un aparato de rayos X diseñado para tal fin llamado mamógrafo. Es la exploración más eficaz para detectar precozmente los tumores malignos de mama y por eso es, además, una prueba de cribado que se realiza a todas las mujeres a partir de 40 años bianualmente en nuestro país.
- **Otras:** en el caso de obtener resultados compatibles con cáncer de mama se realizarían pruebas complementarias como son la **ecografía** o la **biopsia** por punción-aspiración con aguja fina, la biopsia con aguja gruesa o la biopsia quirúrgica. En el caso de mamas densas también se realiza una resonancia nuclear magnética (**RMN**).

## 1.2.6. Subtipos moleculares y tratamientos

La identificación de biomarcadores moleculares desempeña un papel importante en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama. Representan objetivos terapéuticos y su expresión se utiliza para clasificar los diferentes subtipos de cánceres de mama y así seleccionar el tratamiento postquirúrgico.

Según los diferentes subtipos moleculares (**Tabla 3**) los principales biomarcadores del cáncer de mama incluyen los receptores hormonales de estrógeno y progesterona (ER y PR), el receptor epidérmico humano de tipo 2 (HER2/ERBB2) y, con menos relevancia, la proteína Ki-67<sup>7</sup>. Estos marcadores han sido ampliamente estudiados, y su expresión se correlaciona con las diferencias en el comportamiento del tumor y la respuesta del paciente a los tratamientos<sup>8,9</sup>:

- **Los receptores hormonales**, los ER y los PR son los principales factores responsables de la respuesta hormonal. Las glándulas mamarias son un tejido dependiente de hormonas, y su respuesta está controlada por estos receptores<sup>10,11</sup>. La expresión de ER y PR confiere un mejor pronóstico y es la base de la terapia antihormonal.
- **HER2** es un receptor de membrana involucrado en la transducción de señales de proliferación celular. Está presente en las células normales y en la mayoría de los tumores, pero en el 5-15% de los tumores de mama está sobreexpresado, lo que aumenta la agresividad del tumor<sup>12</sup>. Estos tumores suelen ser sensibles a tratamientos anti-HER2, como son los anticuerpos monoclonales o los inhibidores específicos<sup>13</sup>.
- **Ki-67** es un marcador proteico que solo se puede detectar en células en proliferación y se usa actualmente para evaluar la tasa de proliferación de tumores, en particular de los cánceres de mama, endocrinos y cerebrales. Los tumores con altas tasas de proliferación (> 15%) tienen peor pronóstico<sup>14</sup>.

Utilizando estos marcadores moleculares, el cáncer de mama se puede dividir en tres subtipos moleculares principales: **luminal (A, B y C)**, **tipo HER2+** y **cáncer de mama triple negativo (TNBC)**<sup>15-17</sup>, esta división determina el tratamiento como se muestra en la **Tabla 3**. La sobreexpresión de HER2 está relacionada con la falta de expresión de los receptores hormonales en la mayoría de los casos. La misma situación ocurre con el Ki67, que generalmente se encuentra elevado en las células que no expresan estos receptores.

Subtipo	Luminal A	Luminal B	Luminal C	HER2+	TNBC
ER/PR	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
HER2	-	-	+	+	-
Ki67	<15%	>15%	>15%	<15%>	>15%
Tratamientos	Antihormonal			Anti-HER2	
					Quimioterapia
Pronóstico	Bueno			Malo	

**Tabla 3.** Subtipos moleculares de cáncer de mama

#### 1.2.6.1. Luminal A, B y C

Los tumores luminales son **hormonodependientes**, con expresión positiva de receptores de hormonas (ER/PR-positivo). Los tumores **luminal A** son HER2 negativos y presentan tumores de estadio I o II. Representan el **30-70%** de los cánceres de mama<sup>18-20</sup> y tienen el **mejor pronóstico**, con altas tasas de supervivencia y baja recurrencia<sup>21-23</sup>.

Los tumores **luminal B** pueden ser HER2 negativos o positivos; en este último caso, algunos autores lo consideran como un nuevo subtipo llamado **luminal C**<sup>24</sup>, aunque esta clasificación no está muy extendida todavía.

Los tumores luminal B se caracterizan por un estadio tumoral más alto debido a un tamaño tumoral más grande y una diseminación positiva de los ganglios linfáticos.



Los pacientes con tumores luminal B generalmente se diagnostican a edades más avanzadas que en los casos con luminal A<sup>23</sup>. En comparación con los tumores luminal A, también tienden a tener factores que conducen a un peor pronóstico, principalmente un aumento de la proteína Ki67 de 15 a 20%<sup>25,26</sup>. La prevalencia de tumores de tipo luminal B es de aproximadamente el **10 a 20%**<sup>18-20</sup> y aunque muestra altas tasas de supervivencia, no son tan altas como las de los tumores luminal A<sup>23</sup>.

Los tratamientos para ambos subtipos se basan en regímenes de terapia antihormonal<sup>27</sup>, que se basan en el uso de moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), como el tamoxifeno o fulvestrant y los inhibidores de la aromatasa como el anastrozol, exemestano y letrozol<sup>28</sup>.

#### *1.2.6.2. HER2 positivo*

Los tumores de tipo HER2 se caracterizan por ser ER/PR negativo, la **sobreexpresión de HER2**, con una implicación positiva de los ganglios linfáticos y presentan un estadio tumoral intermedio<sup>22,23</sup>. Las pacientes con tumores HER2, por lo general, se diagnostican a una edad más temprana que en el caso de los luminal A y luminal B<sup>23</sup>.

Aproximadamente del 5 al 15% de los cánceres de mama son positivos para HER2<sup>19,20</sup> y se pueden tratar con medicamentos específicos anti-HER2. Este grupo incluye anticuerpos monoclonales como trastuzumab y pertuzumab e inhibidores específicos de HER2 como lapatinib<sup>13</sup>. Antes de que estuvieran disponibles estos fármacos, los tumores de tipo HER2 tenían un mal pronóstico<sup>29</sup>.

#### *1.2.6.3. Triple negativo*

**TNBC** abarca todos los tumores que son negativos para ER, PR y HER2. Se considera el tipo de cáncer de mama más **metastásico** y tiene propiedades altamente invasivas, tiene un peor pronóstico con una alta probabilidad de recidiva, no responde a la terapia hormonal y tiene afectación ganglionar. Alrededor del **10-20%** de los tumores corresponden a tumores triple negativos<sup>18-20</sup>.

Existen varios enfoques para contrarrestar el TNBC, pero todos basados en quimioterapia clásica con antraciclinas, taxanos, inhibidores de la proteína de poli ADP-ribosa polimerasa y agentes quimioterapéuticos que contienen platino<sup>30</sup>.

#### 1.2.6.4.Otros subtipos

Además de los subtipos basados en la expresión de ER, PR y HER2, existen otros subtipos moleculares de cáncer de mama basados en otros patrones de expresión. Estos pueden coincidir con el resto de subtipos, aunque suelen estar más asociados a los TNBC y la combinación de sus fenotipos da lugar a tumores muy agresivos. Los más estudiados en la actualidad son:

- Los **basal-like** (*del inglés similar a basal*), se denominan así por presentar un patrón de expresión de proteínas similar al de las células de la zona basal del epitelio glandular de la mama, este tipo de tumores tiene mayor incidencia en mujeres jóvenes y una alta tasa de recidivas<sup>31,32</sup>.
- Los **claudin-low** (*del inglés claudina baja*), se caracterizan por la baja expresión de los genes implicados en las uniones estrechas (*tight junctions*) y la adhesión de células epiteliales, incluidas las claudinas 3, 4 y 7, la ocludina y la E-cadherina, lo que implica que tienen una mayor facilidad para disgregarse del tumor primario e invadir otros tejidos.

#### 1.2.7.Metástasis

La razón principal por la que el cáncer es una enfermedad tan grave es por su capacidad para extenderse en el cuerpo. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente al moverse dentro del tejido normal circundante y extenderse a regiones adyacentes, a los ganglios linfáticos, a los tejidos o a los órganos cercanos. Además, puede extenderse a regiones lejanas del cuerpo. Cuando sucede esto se llama cáncer metastásico o metástasis, correspondiente al estadio IV.

En este proceso, las células cancerosas se separan del sitio donde se formaron inicialmente, **tumor primario**, se introducen en el sistema vascular o linfático, donde son transportadas, y tras extravasarse en zonas lejanas, forman nuevos tumores, **tumores metastásicos**.

Las células cancerosas se extienden por el cuerpo en varias etapas:

- **Intravasación:** entrada en los ganglios linfáticos o vasos sanguíneos cercanos.
- **Diseminación:** transporte de las células tumorales por el sistema linfático y el torrente sanguíneo a otras partes del cuerpo.
- **Extravasación:** parada en vasos sanguíneos pequeños en un lugar distante, invasión de paredes del vaso sanguíneo e ingreso en el tejido circundante.
- **Proliferación:** crecimiento en ese tejido hasta formar un tumor.

Las condiciones desfavorables que se encuentran las células cancerosas durante el proceso metastásico provocan que la mayoría de estas células mueran antes de llegar a originar una metástasis y solo unas pocas consigan completar dicho proceso en su totalidad. Las células cancerosas metastásicas pueden también permanecer inactivas, quiescentes, en un sitio distante por muchos años antes de que empiecen a crecer de nuevo, si es que lo hacen.

El cáncer puede diseminarse casi a cualquier parte del cuerpo, aunque tipos diferentes de cáncer tienen más probabilidad de diseminarse a algunas zonas más que a otras. Los sitios más comunes a donde se extiende el cáncer son los **huesos**, el **hígado**, los **pulmones** y el **cerebro**. La **Tabla 4** muestra los sitios más comunes de metástasis, sin incluir ganglios linfáticos, para algunos cánceres comunes.

El cáncer metastásico no siempre causa síntomas, pero cuando aparecen, su naturaleza y frecuencia dependerá del tamaño y ubicación de los tumores metastásicos.

Tipo de cáncer	Localización metástasis
Pulmón	Cerebro, glándula suprarrenal, hueso, hígado, otro pulmón
Mama	Cerebro, hígado, hueso, pulmón
Colon-Recto	Hígado, peritoneo, pulmón
Próstata	Glándula suprarrenal, hígado, hueso, pulmón
Estómago	Hígado, peritoneo, pulmón
Útero	Hígado, hueso, peritoneo, pulmón, vagina
Páncreas	Hígado, peritoneo, pulmón
Melanoma	Cerebro, hígado, hueso, músculo, piel, pulmón
Ovario	Hígado, peritoneo, pulmón

**Tabla 4.** Preferencia trófica para el desarrollo de metástasis según los diferentes tipos de cáncer

Algunos signos comunes de cáncer metastásico son:

- Dolor y fracturas, cuando el cáncer se ha diseminado a los huesos.
- Dolor de cabeza, convulsiones o mareos, cuando el cáncer se ha diseminado al cerebro.
- Dificultades respiratorias, cuando el cáncer se ha diseminado al pulmón.
- Ictericia o inflamación del abdomen, cuando el cáncer se ha diseminado al hígado.

La metástasis cerebral presenta ciertas peculiaridades en comparación con el resto de metástasis debido a la presencia de la **barrera hematoencefálica** (BHE). Las metástasis cerebrales son los tumores cerebrales más frecuentes, correspondiendo a casi el **90%** del total de éstos, frente al 10% correspondiente a los tumores primarios en cerebro. Se estima que entre el 15 y 40% de los pacientes con cáncer presenta metástasis cerebrales<sup>33,34</sup>, y su incidencia va en aumento dada la mayor supervivencia media de los pacientes con las terapias actuales. Los tumores tienen una capacidad diferente de metastatizarse en el cerebro y deben tener la capacidad de penetrar la BHE, interactuar con las células residentes y sobrevivir.

Las metástasis cerebrales ocurren en su gran mayoría por **diseminación hematológica** (**Figura 8**). El primer paso para que pueda ocurrir diseminación hematológica es la **invasión** de la pared arterial a nivel del tumor primario, permitiendo de esta forma que algunas células neoplásicas se desprendan y entren al torrente sanguíneo. Posteriormente, estas células deben ser capaces de sobrevivir en la sangre y de **adherirse** a los vasos sanguíneos cerebrales. Una vez adheridas a la pared vascular, las células neoplásicas deben cruzar la **BHE**, la cual está compuesta de un endotelio no fenestrado con uniones intercelulares de oclusión (*tight junctions*), que recubre la microvasculación del cerebro y limita la entrada de macromoléculas y células al parénquima encefálico<sup>35</sup>.

La BHE y la ausencia de un sistema linfático le confieren al cerebro protección significativa a la entrada de muchas drogas y microorganismos, lo que a su vez complica el tratamiento de los tumores cerebrales, pero en algunos casos no es capaz de impedir la entrada de las células neoplásicas<sup>36</sup>.

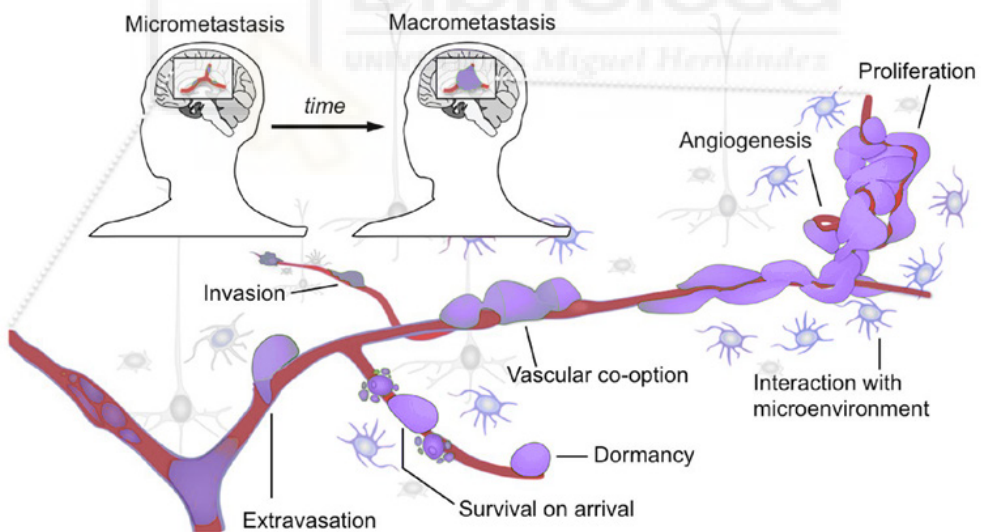
Los mecanismos utilizados por las células neoplásicas para atravesar la BHE continúan siendo motivo de estudio, pero ya se ha demostrado que existen al menos dos mecanismos: atravesando de manera **paracelular**, entre las células de la barrera, y **transcelular**, causando la muerte directa de células de la barrera<sup>37</sup>.

En el caso de la entrada paracelular, las células neoplásicas deben destruir las uniones de oclusión existentes entre las células del endotelio; para esto deben tener la capacidad de expresar proteasas y mediadores inflamatorios<sup>38</sup>.

Una vez que se ha atravesado la BHE, es decir, las células neoplásicas han entrado en la microvasculación del cerebro, estas se extravasan y continúan proliferando e invadiendo el tejido cerebral. La supervivencia y proliferación desde ese momento en adelante es altamente dependiente de la capacidad de mantener un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes.

Esta dependencia explica que las células neoplásicas se mantengan muy próximas a los capilares y vasos sanguíneos, proliferando inicialmente a lo largo de las paredes vasculares<sup>39</sup>, lo cual lleva a la remodelación y cooptación de la vasculación preexistente<sup>40</sup>.

Este proceso ha sido recientemente estudiado en modelos animales de adenocarcinoma pulmonar y de mama, observando que las células metastásicas cooptan a los vasos del cerebro mediante la expresión de la proteína neuroserpina, que bloquea la generación de plasmina, la cual protege al cerebro de metástasis mediante la promoción de la apoptosis de las células neoplásicas e inhibe su propagación a lo largo de la vasculación<sup>41</sup>. También algunos tumores son capaces de favorecer la formación de nuevos vasos sanguíneos (**angiogénesis**) mediada principalmente por VEGF-A, el cual es expresado de forma constitutiva por algunas células neoplásicas, como por ejemplo las de adenocarcinoma pulmonar.



**Figura 8.** Procesos de formación de la metástasis cerebral – Fuente: Modificada de Preusser *et al.* (2018)

## 1.3.Dianas moleculares en el cáncer de mama

### 1.3.1.Ciclo celular

La proliferación celular está vinculada principalmente a la progresión del **ciclo celular** durante el cual se duplica el material genético y se divide la célula en sendas células hijas idénticas. El ciclo celular se divide en la interfase que incluye las fases G1, S y G2, la fase mitótica, o M, y la fase G<sub>0</sub> (**Figura 9**):

- **Fase G1:** es la etapa más larga del ciclo y en ella inicia el aumento del tamaño celular y de la síntesis proteica ya que la célula comienza a duplicar sus orgánulos.
- **Fase S:** durante esta fase la célula sintetiza ADN y proteínas nucleares hasta duplicar el contenido del núcleo.
- **Fase G2:** en esta fase continua el crecimiento celular y se produce la reorganización de los componentes celulares, así como la síntesis de los componentes necesarios para dar comienzo a la división celular.
- **Fase M:** esta fase incluye la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase), o meiosis en el caso de las células germinales, que consisten en la división del material genético, y la citocinesis, cuando se produce la división del citoplasma.
- **Fase G<sub>0</sub>:** hay células que tardan más en dividirse, o que directamente no entran en división celular, por lo que salen del ciclo celular en la fase G1 y entran en un estado de reposo en que no se preparan para dividirse, si no que realizan sus funciones específicas.

Además, el ciclo celular muestra diferentes **puntos de control**, en los que la célula examina las señales internas y externas, y decide si proceder o no con la división celular.

Actualmente se conocen tres puntos de control:

- Punto de control **G1/S**: antes de que comience la fase S la célula debe tener el tamaño y la disposición de nutrientes adecuada, así como no presentar errores en su material genético que pueda transmitir a las células hijas.
- Punto de control de **G2/M**: el ciclo no continúa si existe daño en el ADN o no se ha replicado correctamente al final de la fase G2.
- Punto de control **M**: si en la transición durante la metafase y la anafase los cromosomas no se encuentran adecuadamente alineados y fijados al huso mitótico no prosigue la mitosis.

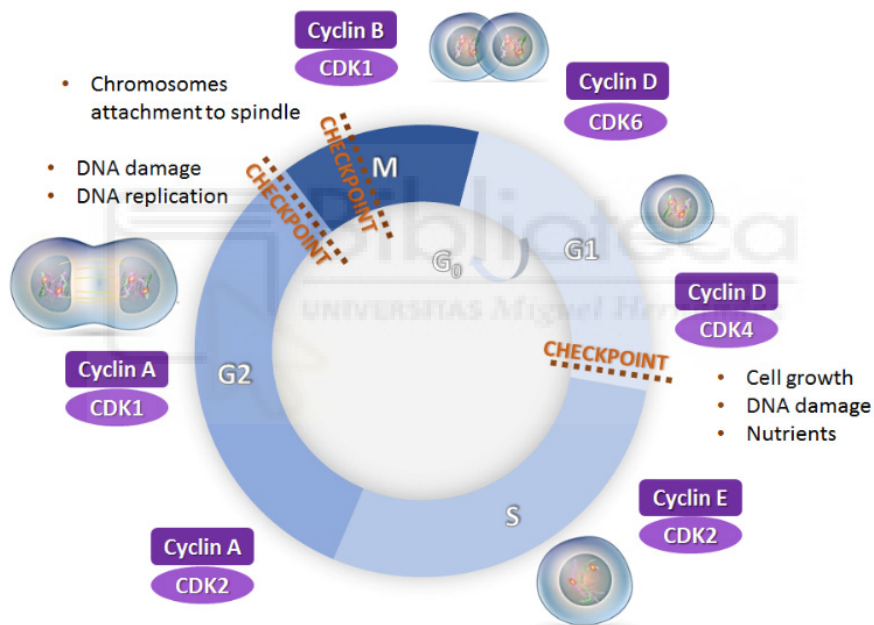


Figura 9. El ciclo celular y sus puntos de control

Una de las características principales de las células tumorales, independientemente de su origen, es su capacidad para crecer y proliferar de manera incontrolada. Esta división celular incontrolada es causada por un mal funcionamiento de los puntos de control del ciclo celular<sup>2,42</sup>. Los reguladores más importantes del ciclo son las proteínas llamadas **ciclinas**, las enzimas llamadas quinasas dependientes de ciclinas (**CDK**) y los complejos enzimáticos promotores de la anafase (**APC/C**)<sup>43,44</sup>.



El perfil de expresión de las diferentes ciclinas varía aumentando en cada fase la ciclina que activa la CDK responsable de promover en cada fase las funciones necesarias, por ejemplo, la ciclina E activa la CDK2 que a su vez promueve la duplicación del ADN.

Además, los complejos de CDK activos están regulados por la unión a inhibidores de CDK, por ejemplo, p21 y p27, así como por otras quinasas y fosfatasa, controlando todas ellas el ciclo celular al equilibrar la actividad de CDK. Las variaciones en la concentración de estos inhibidores pueden alterar la secuencia normal del ciclo celular como ocurre en algunos tumores o en células envejecidas, por ejemplo, p53, una proteína que aumenta cuando hay presencia de daño en el ADN y que activa la transcripción de p21, está mutada en más del 50% de todos los tumores en humanos.

### 1.3.2. Muerte celular

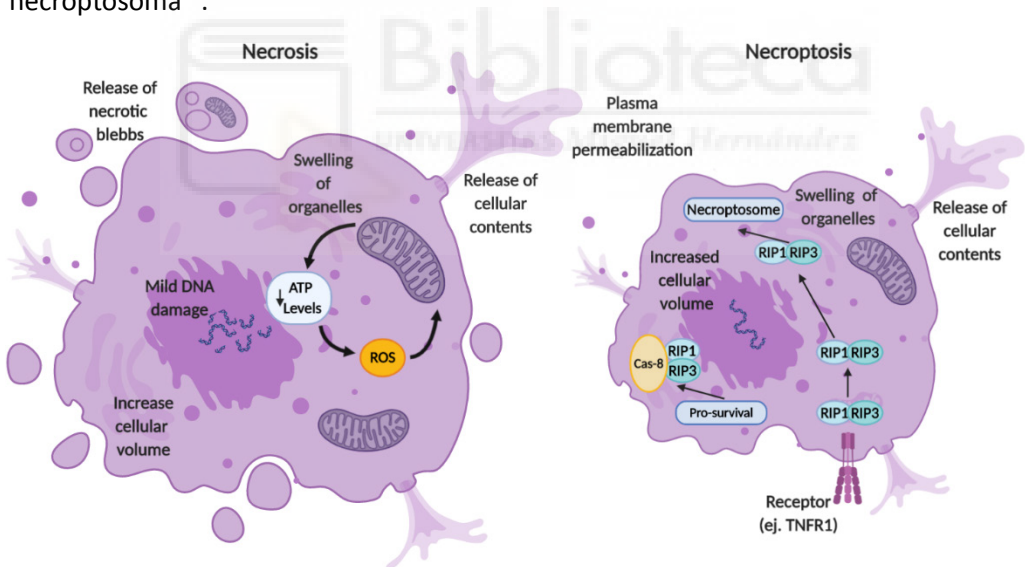
Los diferentes tipos de muerte celular y su estudio en relación con los mecanismos de supervivencia de las células tumorales constituyen uno de los principales objetivos dentro de la investigación y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales ya que son mecanismos desregulados en las células tumorales que sirven como dianas terapéuticas.

#### *1.3.2.1. Necrosis/Necroptosis*

La **necrosis** es un proceso de muerte celular no fisiológico y está causada por un agente nocivo (hipoxia, toxinas, lesiones, etc.). Morfológicamente se caracteriza por la ganancia de volumen celular (oncosis), la permeabilización de la membrana plasmática y la salida del material citoplasmático, que provoca la ruptura de los orgánulos citoplasmáticos, principalmente la mitocondria, desencadenando así una rápida pérdida de los potenciales de membrana<sup>45,46</sup> (**Figura 10**).

Este proceso va acompañado de una inflamación en el tejido circundante y de procesos de cicatrización, que dan lugar a fibrosis en el tejido afectado.

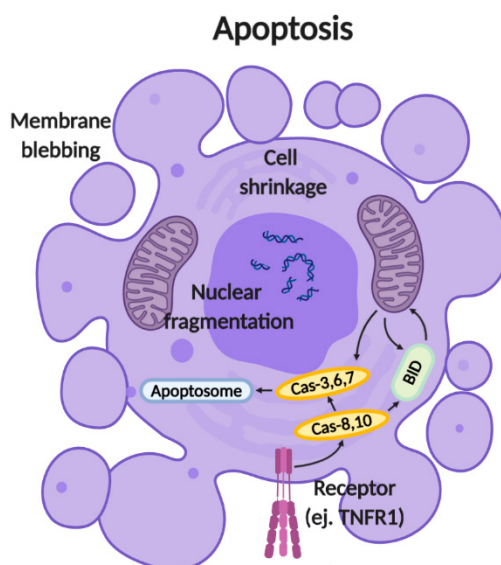
La **necroptosis** es un mecanismo de muerte celular con características similares a la necrosis pero que, a diferencia de esta, se encuentra regulada al igual que la apoptosis. Esta forma de muerte celular se suele asociar con las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales, se corresponde a respuestas contra infecciones mediadas por patógenos y se caracteriza morfológicamente por la inflamación celular seguida de la ruptura de la membrana plasmática (**Figura 10**). Es considerada una alternativa de muerte celular cuando la vía apoptótica dependiente de caspasa-8 está bloqueada. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es el desencadenante, junto con Fas o TRAIL, que da lugar a la inhibición previa de la cascada de caspasas, a la activación de RIPK1 o RIPK3 y al posterior reclutamiento de MLKL y la formación del complejo molecular necroptosoma<sup>47</sup>.



**Figura 10.** Mecanismo de necrosis/necroptosis – Fuente: Creada con BioRender.com

### 1.3.2.1. Apoptosis

La **apoptosis** es el principal mecanismo de muerte celular programada. Se caracteriza por una serie de procesos moleculares que dan como resultado la zeiosis o formación de protuberancias en la membrana celular, la fragmentación del ADN nuclear y cromosómico, la condensación y fragmentación de la cromatina, y la translocación de fosfatidilserina (FS) a la cara externa



**Figura 11.** Mecanismo de apoptosis – Fuente: Creada con BioRender.com

de la membrana plasmática (**Figura 11**), lo que implica el reconocimiento de la célula apoptótica por los macrófagos y su consiguiente eliminación por estos<sup>48-50</sup>.

Hay dos vías apoptóticas diferentes, principalmente diferenciadas por sus estímulos iniciales. Estas dos vías pueden superponerse y compartir algunas dianas moleculares como caspasas<sup>48</sup>. Por un lado, la **vía extrínseca** o de los receptores de muerte que está mediada por ligandos que se unen a los receptores en la superficie celular. Alternativamente, la **vía intrínseca** o mitocondrial que está mediada por el estrés celular o por la lesión del ADN.

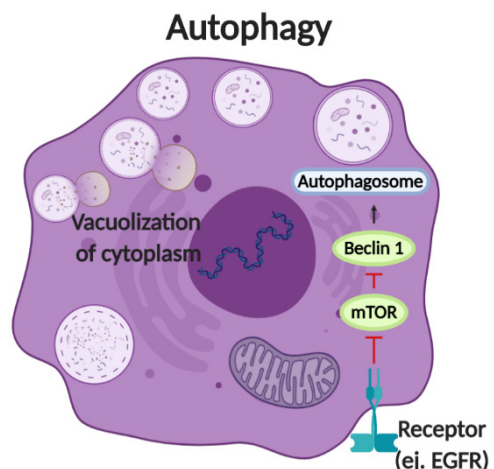
La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se debe a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid incrementando enormemente su actividad proapoptótica que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del Citocromo C. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de las condiciones, este solapamiento es mínimo, y las dos vías operan de manera independiente<sup>51</sup>.

Hay varios mecanismos moleculares que utilizan las células tumorales para suprimir la apoptosis. Por ejemplo, las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis mediante la regulación positiva de la expresión de Bcl-2 anti-apoptótica o la mutación de la proteína BAX pro-apoptótica. La expresión de ambas está regulada por el gen supresor de tumores p53<sup>52</sup>, que está mutado en un gran número de tipos de cáncer<sup>14</sup>

### 1.3.2.2. Autofagia

Inicialmente, la **autofagia** o autodigestión celular es una ruta involucrada en la degradación de proteínas y orgánulos para el reciclaje de componentes celulares, aunque también puede ser importante en la patogénesis de algunas enfermedades. Disfunciones en los procesos de la autofagia se asocian con enfermedades como el cáncer<sup>53-55</sup>, la neurodegeneración<sup>56,57</sup>, el envejecimiento<sup>57,58</sup> y las infecciones<sup>59,60</sup>.

Morfológicamente se caracteriza por la vacuolización del citoplasma (**Figura 12**) y las principales proteínas involucradas en la regulación de la autofagia son mTOR, fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), AKT quinasa (AKT), Beclin-1 y p53<sup>61</sup>. La activación de la ruta PI3K/AKT implica la activación de mTOR, lo que lleva a la inhibición de la autofagia<sup>62</sup>; por el contrario, la inhibición de mTOR está relacionada con la activación de la autofagia. Además de mTOR, existe una familia de proteínas llamada ATG (proteína relacionada con la autofagia), como LC3, ATG5 o ATG12, que también están involucradas en la regulación de este mecanismo.



**Figura 12.** Mecanismo de autofagia – Fuente: Creada con BioRender.com

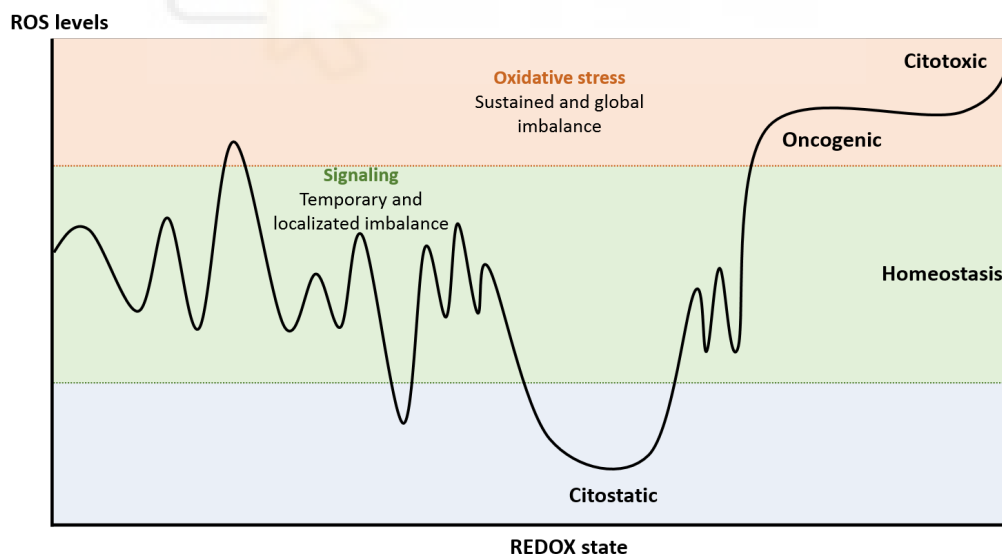
### 1.3.3. Balance REDOX

El **estrés oxidativo** es causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la eficacia de los sistemas antioxidantes endógenos. Los tejidos están continuamente expuestos a los radicales libres derivados del metabolismo o debido a factores externos como la contaminación o la radiación<sup>63</sup>.

De hecho, las ROS participan en funciones fisiológicas como la señalización del metabolismo y la defensa contra las infecciones<sup>64,65</sup> (**Figura 13**).

Sin embargo, la producción o acumulación de ROS no controlada puede inducir la peroxidación de lípidos, modificaciones de proteínas y daños en el ADN, así como un estrés reductor provoca una disminución del metabolismo que puede desembocar en un efecto citostático<sup>66</sup>.

Estos eventos conducen a alteraciones de la membrana, disfunciones de las proteínas y alteraciones genéticas, todas ellas relacionadas con la carcinogénesis y la progresión tumoral.



**Figura 13.** Estado REDOX según niveles de ROS

El equilibrio entre las especies oxidantes y los antioxidantes (equilibrio redox) es esencial para mantener un estado celular saludable.

El cáncer de mama se caracteriza por un estado prooxidante sistémico<sup>67</sup>, y el aumento de la presencia de ROS es determinante para algunos eventos relevantes, como la progresión tumoral mediada por células estromales<sup>68</sup>. Sin embargo, las ROS pueden desempeñar una doble función<sup>69</sup>, no solo en el cáncer de mama<sup>70</sup>, sino en todos los cánceres.

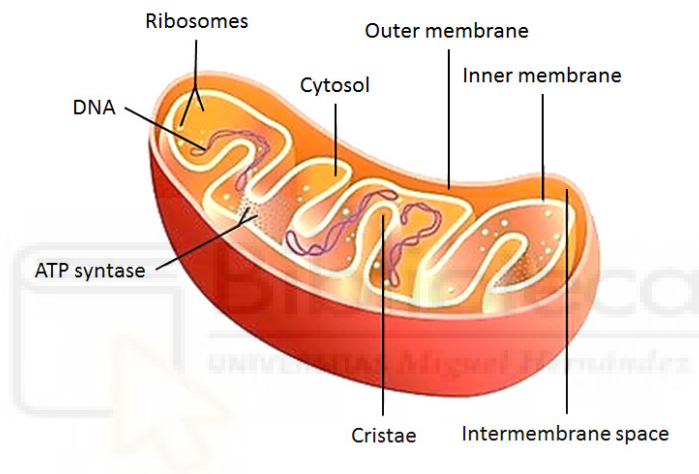
Las células tienen varios mecanismos para transformar y eliminar ROS evitando sus efectos nocivos, como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa<sup>71-73</sup>. La sinergia entre estas enzimas, vitaminas y antioxidantes exógenos, como los polifenoles, permite neutralizar el exceso de radicales libres y modular la señalización celular contribuyendo a mantener el equilibrio redox<sup>22</sup>.

Inicialmente, el aumento de la producción de ROS conduce a una situación prooncogénica, ya que provoca dos efectos cruciales: la **disfunción mitocondrial**, que conduce a la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos, y el **daño en el ADN**.

Por otro lado, una vez que las células tumorales se han desarrollado, un aumento en la presencia de ROS puede conducir a la muerte de las células tumorales. Este hecho se ha relacionado con algunos medicamentos contra el cáncer, como la doxorubicina y el paclitaxel, y determina que el uso de prooxidantes puede ser una buena aproximación terapéutica.

### 1.3.4. Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

Las **mitocondrias** son orgánulos intracelulares presentes en todas las células eucariotas. Su función es suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, sintetizando adenosil-3-fosfato (**ATP**) a partir de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos mediante la **fosforilación oxidativa**<sup>74</sup>. Están compuestas por un sistema de **dobles membranas**, una externa y una interna, que separan tres espacios, el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (**Figura 14**).



**Figura 14.** Estructura de la mitocondria

El potencial de membrana mitocondrial consiste en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana y la energía que impulsa dicho gradiente proviene de la transferencia de electrones de la cadena transportadora.

La pérdida de potencial de membrana mitocondrial, consecuencia de que la cadena transportadora de electrones sufra alteraciones, deriva en la generación de ROS y por ello se considera que juega un importante papel en la regulación del **estrés oxidativo intracelular**<sup>75</sup>.

El daño oxidativo mitocondrial está implicado en la regulación de las principales muertes celulares, tanto de la apoptosis como de la necrosis<sup>76</sup>. La permeabilización de la membrana mitocondrial junto a la liberación de proteínas al espacio intermembrana son características importantes de ambos mecanismos de muerte lo que convierte a la mitocondria en una diana para promover la muerte celular.

### 1.3.5.ER y producción de estrógenos

Tal y como se ha comentado antes, la dependencia de hormonas es un factor crucial en los tumores de mama. Esta dependencia se fundamenta en diferentes dianas moleculares. En primer lugar, por su importancia hay que citar a los receptores de estrógenos. Los estrógenos ejercen su acción biológica al unirse a estos receptores.

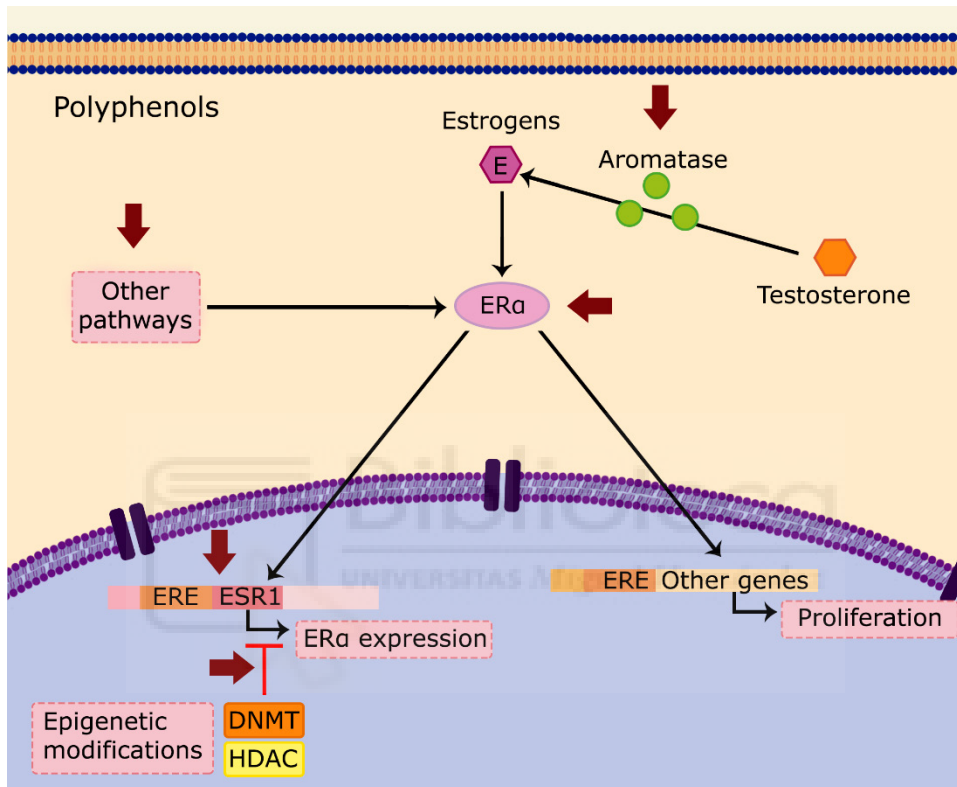
Existen dos tipos diferentes, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , ambos miembros de la superfamilia de receptores de factores de transcripción. Aunque ambos ER pueden desarrollar respuestas relacionadas con el estrógeno, ER $\alpha$  es el que desempeña un papel importante en el cáncer de mama (en este trabajo, el término "ER" se usará para referirse al "ER $\alpha$ ").

La enzima **aromatasa**, un miembro de la superfamilia de enzimas CYP, está codificada por el gen CYP19 y es otra de las principales dianas moleculares para el tratamiento del cáncer de mama<sup>77</sup>. Su función es aromatizar los andrógenos, produciendo estrógenos. Una estrategia para contrarrestar el efecto proliferativo del estrógeno en el cáncer de mama es usar inhibidores de la aromatasa (**Figura 15**).

Además de los mecanismos mencionados anteriormente, otra estrategia terapéutica sería transformar los fenotipos ER-negativos en ER-positivos, mejorando así el pronóstico y permitiendo el tratamiento con SERMs como el tamoxifeno. Esta transformación puede deberse a modificaciones epigenéticas mediadas por enzimas modificadoras de la cromatina, tales como DNMT (ADN metiltransferasas) y HDAC



(histona deacetilasas)<sup>78-80</sup>. La **metilación** de la codificación del gen **ESR1** para ER se asocia con el fenotipo ER-negativo y, por lo tanto, apoya la hipótesis de que el tratamiento con inhibidores de DNMT y activadores de HDAC puede promover la expresión de ER al revertir el fenotipo ER-negativo a ER- positivo<sup>81</sup>.



**Figura 15.** Dianas terapéuticas frente a la actividad estrogénica (Flechas granates) – Fuente: Modificada de Losada-Echeberria *et al.* (2017)

### 1.3.6. Sobreexpresión de HER2, Hsp90 y FASN

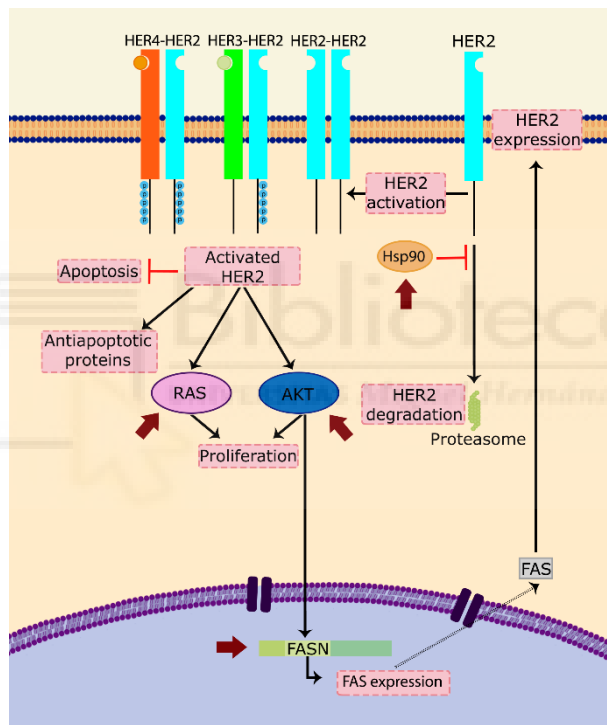
**HER2**, también denominado ERBB2 o EGFR2, se sobreexpresa en más del 30% de los cánceres de mama y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la progresión de ciertos cánceres de mama agresivos. HER2 es un receptor transmembrana tirosinquinasa que activa múltiples vías de señalización proliferativa, incluyendo las mediadas por PI3K/AKT y Ras/MAPK<sup>77</sup>.

Tras su activación, HER2 puede homo o heterodimerizar con otros receptores de la familia HER, lo que lleva a la transducción de señales y la proliferación celular. Esta es la razón principal por la cual la sobreexpresión de HER2 conduce a una proliferación anormal y la propagación del cáncer. Además de este mecanismo principal, sin embargo, también se ha demostrado que varios mecanismos apoptóticos están desregulados en las células que sobreexpresan HER2<sup>82,83</sup> y que, a su vez, sobreexpresan algunas **proteínas antiapoptóticas**, incluyendo Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1<sup>84</sup>. Estos dos mecanismos contribuyen a la supervivencia de las células tumorales y su diseminación.

Hoy en día, la terapia más utilizada contra los tumores positivos para HER2 es el anticuerpo monoclonal **trastuzumab**<sup>85</sup>. Este tratamiento ha revolucionado positivamente el pronóstico de este tipo de tumor; sin embargo, el principal problema que presentan estos pacientes es el desarrollo de **resistencia** al trastuzumab. Para contrarrestar esta resistencia se puede recurrir al uso de coadyuvantes que sensibilicen las células positivas para HER2 a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, disminuyendo su activación o inhibiendo su expresión.

Por otro lado, HER2 necesita de **Hsp90** para poder dimerizar y así adquirir su función<sup>86,87</sup>, por lo que otro posible enfoque terapéutico es el uso de inhibidores de Hsp90, causando que los monómeros de HER2 sean degradados por el proteasoma<sup>88,89</sup> (**Figura 16**).

También se ha relacionado la sintasa de ácidos grasos (**FASN**) con varios tipos de cáncer<sup>90</sup>. Se ha demostrado que la sobreexpresión de HER2 aumenta la traducción de FASN, lo que altera la actividad de mTOR y la vía de señalización PI3K/AKT en células de cáncer de mama<sup>91</sup>. La inhibición de FASN induce **apoptosis** y crea citotoxicidad<sup>92,93</sup>, pero también causa una disminución marcada en las formas activas de la proteína HER2, lo que indica que el oncogén HER2 presenta **retroalimentación positiva** con FASN para asegurar una biogénesis hiperactiva de los ácidos grasos. En consecuencia, la inhibición de FASN se correlaciona con una inhibición de HER2.



**Figura 16.** Dianas terapéuticas frente a la actividad de HER2 (Flechas granates) – Fuente: Modificada de Losada-Echeberria *et al.* (2017)

## 1.4. Índice terapéutico

El **índice terapéutico** (IT) constituye una medida del margen de seguridad de un fármaco, compara la concentración sanguínea en la cual un medicamento es tóxico con la concentración en la cual es eficaz. Se expresa como una relación entre la dosis que causa la muerte del 50% de la población (dosis letal 50 o **DL<sub>50</sub>**) y la dosis que causa el efecto terapéutico deseado en el 50% de la población (dosis efectiva 50 o **DE<sub>50</sub>**)<sup>108</sup>(**Figura 19**). Este concepto se formula como:

$$IT = \frac{DL_{50}}{DE_{50}}$$

**Ecuación 1.** Fórmula para el cálculo del Índice Terapéutico

En el caso de los estudios *in vitro*, donde no se trabaja con una población de humanos si no con una población celular y donde modelamos tejido sano y tejido tumoral en el caso del cáncer, se puede realizar la siguiente aproximación para calcular el IT si tenemos en cuenta como **DL<sub>50</sub>** la muerte del **tejido sano**, o la **IC<sub>50</sub>** de la **línea celular control**, y **DE<sub>50</sub>** la muerte del **tejido tumoral**, o **IC<sub>50</sub>** de la **línea celular tumoral**<sup>108,109</sup>:

$$IT = \frac{DL_{50}}{DE_{50}} = \frac{DL_{50} \text{ tejido sano}}{DE_{50} \text{ tejido enfermo}} = \frac{IC_{50} \text{ línea celular control}}{IC_{50} \text{ línea celular tumoral}}$$

**Ecuación 2.** Aproximación para el cálculo del Índice Terapéutico a partir de datos *in vitro*

Se considera que un fármaco es seguro cuando su IT es mayor o igual a 10 y se denominan fármacos de **índice terapéutico estrecho** (NTI, del inglés *Narrow Therapeutic Index*) a aquellos cuyo el IT se reduce hasta 2<sup>110</sup>. Los fármacos con NTI requieren de farmacovigilancia y monitorización clínica y se justifica el aumento de dosis, dando prioridad a la eficacia sobre la seguridad, cuando la gravedad de la patología presenta un riesgo mayor que la toxicidad del fármaco, como en el caso del cáncer o de infecciones graves.

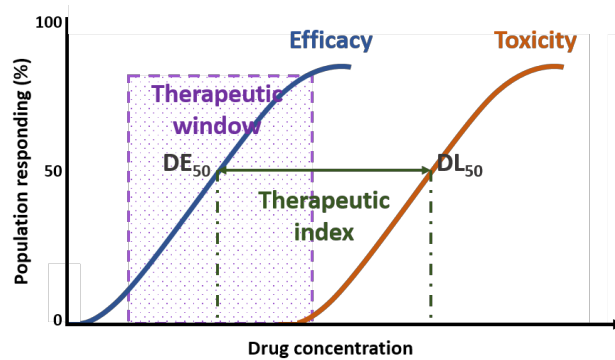


Figura 17. Índice terapéutico y ventana terapéutica

## 1.5. Biodisponibilidad

Todo compuesto que ha demostrado su papel en la prevención o tratamiento en estudios *in vitro* debe ser capaz a su vez de alcanzar los tejidos donde han de ejercer su acción y debe hacerlo en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Por ello, es un punto clave realizar estudios de su **biodisponibilidad** *in vivo* para conocer la **absorción**, la **distribución**, el **metabolismo** y **excreción** (ADME) de estos compuestos en el organismo (Figura 18).

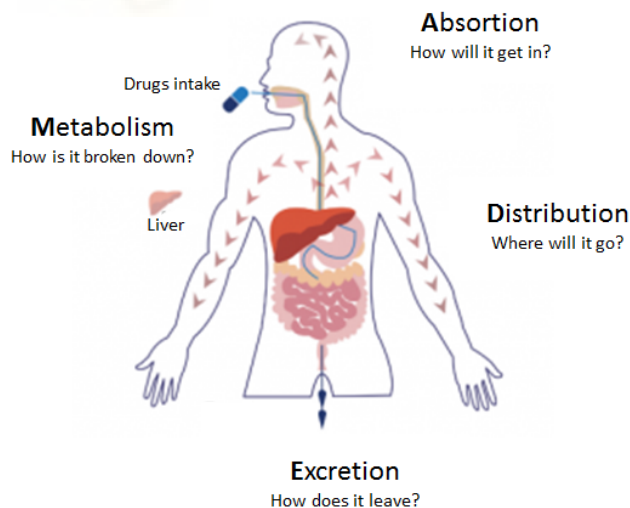


Figura 18. Proceso ADME

Según la FDA, se define como biodisponibilidad la velocidad y cantidad a la cual un compuesto activo se hace disponible en el lugar de acción para llevar a cabo su actividad biológica<sup>111</sup>.

Muchos estudios exponen que la biodisponibilidad de los polifenoles no es excesivamente alta debido a factores tales como baja absorción, la inestabilidad, el metabolismo o la transformación sufrida por la microbiota intestinal<sup>112</sup>. Pero a pesar de su baja biodisponibilidad existen múltiples estudios que evidencian la actividad biológica de estos compuestos a bajas concentraciones en plasma<sup>113-116</sup>.

En el caso de los compuestos fenólicos tanto su estructura química como la naturaleza de la matriz donde se encuentran disueltos influyen en su absorción y metabolismo tras la ingesta, así como en su actividad biológica<sup>117</sup>.

Generalmente los polifenoles presentes en los alimentos se encuentran en sus formas de glucósidos, unidas a un resto glucídico. Estas formas no pueden ser absorbidos directamente por el epitelio intestinal ya que solo la forma aglicona (sin el azúcar) es absorbida.

En el intestino delgado, los polifenoles unidos al resto glucídico se deglucosilan a su forma aglicona por la lactasa-floricina hidrolasa (LPH) o la  $\beta$ -glucosidasa citosólica (CBG) de las células epiteliales intestinales y luego se convierten en conjugados de O-glucurónido/O-sulfato por enzimas de la fase II intestinales<sup>118</sup>.

Estos metabolitos conjugados son absorbidos y posteriormente se transportan al hígado, donde continúan metabolizándose. Después de su paso por el hígado, ingresan a la circulación sanguínea general o regresan al tracto digestivo a través de la circulación enterohepática<sup>119</sup>. La concentración total de metabolitos conjugados de los polifenoles puede alcanzar niveles micromolares en unas pocas horas y luego desaparecer casi totalmente después de 24 horas<sup>120</sup>.

Estas transformaciones son las que dificultan la detección de los compuestos fenólicos en plasma y tejidos ya que las formas que llegan al sitio de acción difieren de las presentes en la fórmula administrada y por ello es necesario buscar sus **metabolitos** y evaluar su actividad biológica.

## 1.6. Aditividad, sinergia y antagonismo

Cuando se estudian los posibles efectos farmacológicos (capacidad antiproliferativa, actividad antioxidante, etc.) de cualquier combinación de compuestos en un ensayo biológico puede darse entre ellos diferentes efectos que modifiquen su actividad farmacológica. Estas interacciones entre los diferentes compuestos son la **sinergia**, el **antagonismo** y la **aditividad**.

La sinergia es el fenómeno por el que la combinación entre dos o más compuestos produce un efecto total mayor que la suma del efecto de cada compuesto por separado. El antagonismo por el contrario se produce cuando el efecto total es menor que la suma de los efectos por separado, debido a que se produce una inhibición entre los compuestos. Si no se produce ninguno de estos efectos lo que ocurre es un efecto de aditividad por el cual el efecto total es igual a la suma de los efectos por separado. Para determinar cuál de los fenómenos tiene lugar se estudia la relación dosis-respuesta de cada compuesto por separado y en combinación.

El análisis cuantitativo de la posible sinergia de las combinaciones de los compuestos se realiza mediante el cálculo del **Índice Fraccionario de Concentración Inhibidora** (FICI), que se calcula de la siguiente forma, siendo **1, 2, n** los compuestos que queremos estudiar e **IC<sub>50</sub>** la concentración a la que se inhibe el 50% de la actividad estudiada<sup>121</sup>:

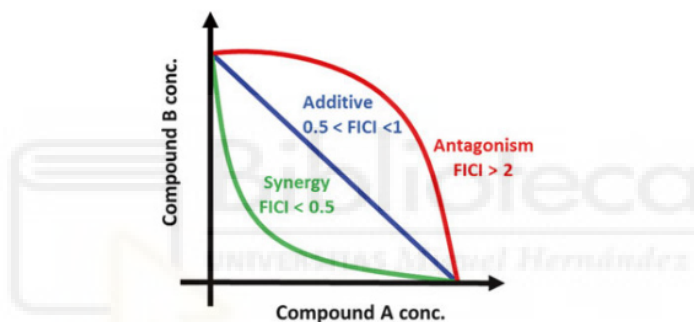
$$FICI = \frac{IC_{50} \text{ Compuesto 1 en combinación}}{IC_{50} \text{ Compuesto 1 en solitario}} + \frac{IC_{50} \text{ Compuesto 2 en combinación}}{IC_{50} \text{ Compuesto 2 en solitario}} + \dots + \frac{IC_{50} \text{ Compuesto n en combinación}}{IC_{50} \text{ Compuesto n en solitario}}$$

**Ecuación 3.** Fórmula para el cálculo del Índice Fraccionario de Concentración Inhibitoria

Esta fórmula proporciona un valor numérico que se interpreta de la siguiente forma:

- $FICI \leq 0,5 \rightarrow$  Sinergia
- $0,5 < FICI \leq 2 \rightarrow$  Aditividad
- $FICI \geq 2 \rightarrow$  Antagonismo

El tipo de efecto se puede también determinar mediante los **isobogramas** que son representaciones gráficas de los puntos obtenidos de la concentración con la que contribuye cada compuesto para un efecto del 50% para diferentes ratios de combinación. De manera que al unir los puntos obtenidos para las diferentes ratios puede aparecer una línea recta, indicando aditividad, una curva cóncava, que indica sinergia, o una curva convexa que muestra antagonismo (**Figura 19**).



**Figura 19.** Representación esquemática del método de isobograma – Fuente: Barrajón-Catalan *et al.* (2014)

Otra alternativa para determinar si existe sinergia es el cálculo del **Índice de Combinación** (CI), que se calcula de la siguiente forma siendo **1, 2, n** los compuestos que queremos estudiar, **D** la dosis o concentración necesaria para un determinado porcentaje de inhibición **x**, **f<sub>a</sub>** la fracción afectada (efecto farmacológico causado expresado en tanto por uno), **D<sub>m</sub>** la dosis correspondiente con el efecto medio y **m** la pendiente de la ecuación correspondiente al compuesto<sup>122,123</sup>:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \dots + \frac{(D)_n}{(D_x)_n} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 \left[ \frac{f_a}{1-f_a} \right]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 \left[ \frac{f_a}{1-f_a} \right]^{1/m_2}} + \dots + \frac{(D)_n}{(D_m)_n \left[ \frac{f_a}{1-f_a} \right]^{1/m_n}}$$

**Ecuación 4.** Fórmula para el cálculo del Índice de Combinación



La interpretación de los valores de CI es:

- $CI < 1 \rightarrow$  Sinergia
- $CI = 1 \rightarrow$  Aditividad
- $CI > 1 \rightarrow$  Antagonismo

El valor de CI se puede calcular para diferentes fracciones afectadas ( $f_a$ ) del efecto causado y de esta forma determinar si se producen diferentes interacciones entre ambos compuestos a bajas o altas dosis.

El efecto sinérgico entre dos o más compuestos puede explicarse mediante varios mecanismos. En primer lugar, la sinergia puede deberse al efecto de los compuestos sobre **múltiples dianas** en lugar de afectar a una única diana. Otra explicación puede basarse en que la combinación de los compuestos mejore su **solubilidad** y que esto conlleve una mejora de sus propiedades fisicoquímicas y por tanto farmacodinámicas.

También podría ocurrir que los compuestos produzcan un antagonismo sobre los distintos **mecanismos de resistencia** de las células tumorales, en combinación con otros fármacos antitumorales.

Y por último la sinergia puede deberse a la eliminación o **neutralización** de una sustancia que actúe negativamente sobre el fármaco, de forma que la acción combinada aumente su efecto<sup>124</sup>.

Por todo lo anteriormente expuesto, es de vital importancia realizar un estudio de las interacciones farmacológicas entre los diversos compuestos de un tratamiento ya que pueden provocar tanto un efecto de sobredosis como de infradosificación.

Además, es útil para estudiar la asociación de diferentes compuestos que podrían ver su actividad potenciada. Algunos ejemplos son el uso combinado de paracetamol con codeína para potenciar su efecto analgésico<sup>125</sup> o el uso de la amoxicilina con el ácido clavulánico como combinación con actividad antibiótica.

Estudios de este tipo sobre búsquedas de efecto sinérgico se llevan a cabo para campos tan diversos como el cáncer, por ejemplo en el presente trabajo, los antimicrobianos<sup>121</sup>, los antioxidantes<sup>126</sup>, los antivirales<sup>127</sup> o protectores gástricos<sup>128</sup>.

## 1.7. Compuestos naturales bioactivos

Los **compuestos naturales bioactivos** (CNBs) son un tipo de sustancias químicas, fruto del metabolismo secundario, que se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas, bacterias y algunos organismos marinos, y que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos.

Cuando se plantea el uso de CNBs como fuente de compuestos con relevancia farmacológica hay que tener en cuenta los conceptos de hormesis y xenohormesis. Desde un punto de vista biomédico, la hormesis es una respuesta adaptativa en la que la exposición a una dosis baja de un compuesto químico, que es perjudicial en altas concentraciones, tiene un efecto beneficioso o adaptativo en una célula u organismo.

A veces, esta respuesta es mediada por algunos CNBs que, cuando se incorporan a la dieta, inducen respuestas biológicas que conducen a efectos farmacológicos y que pueden por tanto tener efectos beneficiosos para la salud humana. Este efecto final se denomina xenohormesis, ya que es otro organismo el que obtiene el beneficio final y no el organismo productor de los compuestos<sup>94</sup>.

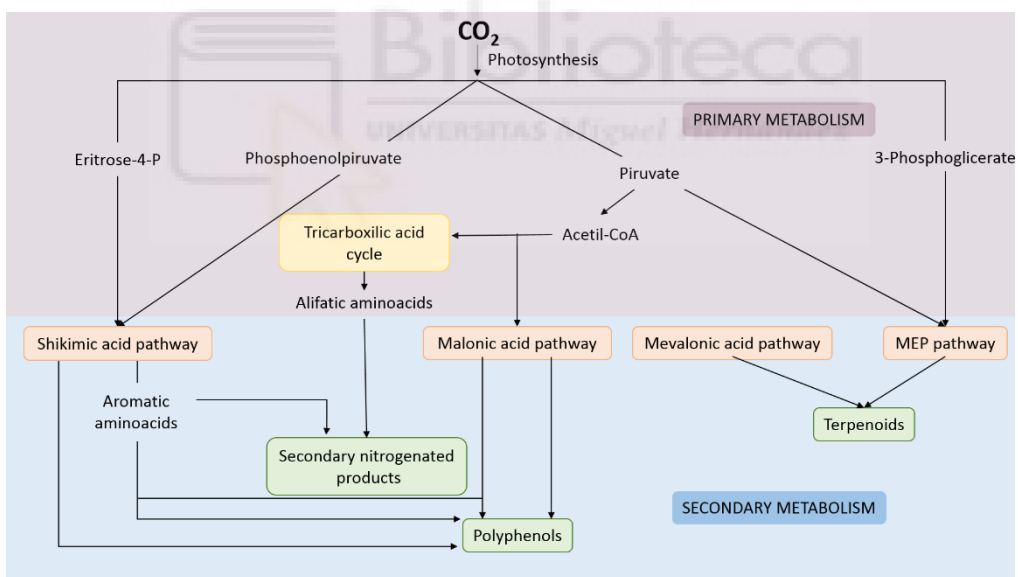
En los últimos años, los CNBs han generado un gran interés desde el punto de vista científico debido a su potencial utilidad como tratamiento y prevención en diferentes enfermedades, por ejemplo del cáncer<sup>95-97</sup>, la diabetes<sup>98,99</sup>, la demencia<sup>100</sup> o las enfermedades cardiovasculares<sup>101</sup>.

Existen numerosos estudios que avalan la actividad antitumoral de los compuestos de origen natural en diferentes modelos<sup>102</sup>. En concreto, para el cáncer de mama se han obtenido interesantes resultados con una mezcla de extracto de té y quercetina<sup>103</sup>, con extracto de pino radiata<sup>104,105</sup>, con extracto de loto indio<sup>105</sup>, con extracto del líquen *Hypogymnia physodes*<sup>106</sup> o con extracto de noni<sup>107</sup> entre otros.

Los principales CBNs proceden del metabolismo secundario de plantas y son compuestos sintetizados en situaciones de estrés (hídrico, térmico, salino, etc.) como defensa o adaptación al medio.

Los grupos más importantes son los siguientes (**Figura 20**):

- ◆ **Polifenoles**
- ◆ **Terpenoides**
- ◆ **Sustancias nitrogenadas o alcaloides**



**Figura 20.** Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario del carbono – Fuente: adaptada de Taiz *et al.* (2006)

### 1.7.1. Polifenoles: estructura y clasificación

Los **polifenoles** son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos.

Son productos derivados del metabolismo secundario de las plantas y su biosíntesis tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del **ácido siquímico** y la ruta del **ácido malónico** (Figura 20).

Se caracterizan por presentar uno o más **núcleos aromáticos** sustituidos, como mínimo, con un **grupo hidroxilo**, que les confiere la propiedad de donar átomos de hidrogeno lo que a su vez les permite actuar como antioxidantes y desempeñar funciones fisiológicas en los vegetales o bien intervenir en funciones de defensa ante diferentes situaciones de estrés.

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los grupos sustituyentes que presentan estos anillos. Como muestra la **Figura 21**, los principales grupos de polifenoles son: **ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, y lignanos**.

Los flavonoides, nombre que deriva del latín *flavus* y cuyo significado es amarillo haciendo referencia a su característica coloración amarillenta, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal<sup>101</sup>.

Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: **flavonoles, flavonas, flavanonas** (dihidroflavonas), **isoflavonas** y **antocianidinas**.

## Polyphenols

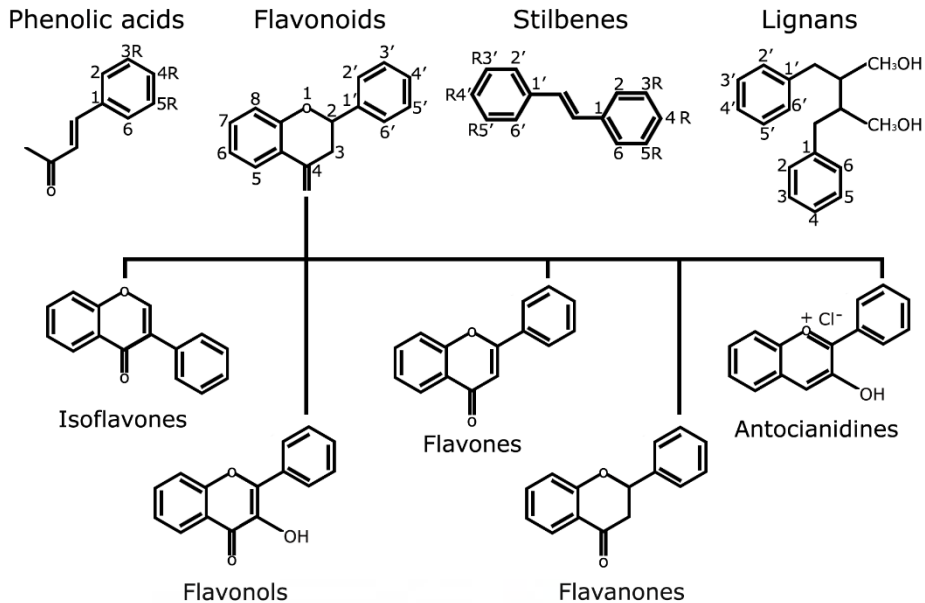


Figura 21. Principales grupos de polifenoles – Fuente: Losada-Echeberria *et al.* (2017)

### 1.8. Uso de un extracto de hoja de olivo

El olivo, *Olea europaea*, es una planta de la familia de las oleáceas naturalmente distribuida en la cuenca mediterránea.

Se trata de un árbol con un ciclo vegetativo reproductor bienal, es decir, que necesitan de dos estaciones o periodos vegetativos desde que se siembra hasta que florecen (**Figura 22**). Estas plantas crecen vegetativamente el primer año mientras que en el segundo florecen y dan los frutos. Esto implica que el crecimiento de los brotes está muy afectado por la floración y fructificación que ocurre en paralelo de los brotes anteriores ya que la planta prioriza estos procesos a la hora de destinar los nutrientes.

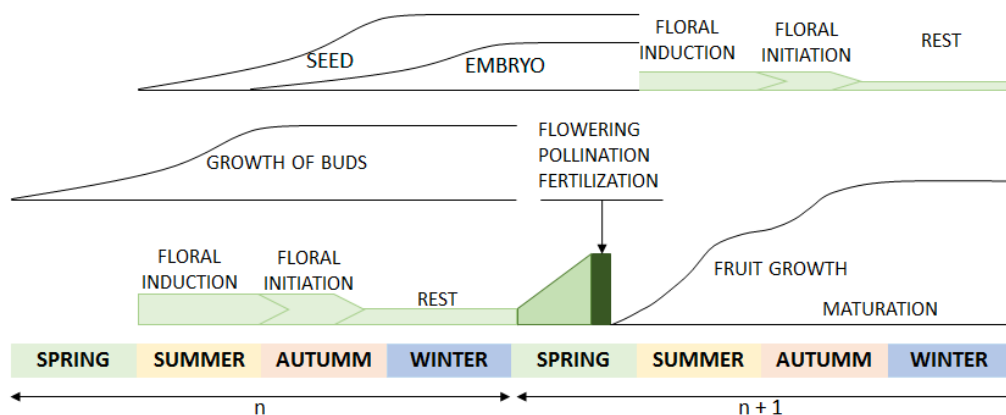


Figura 22. Ciclo vegetativo y reproductor del olivo. – Fuente: Ralo *et al.* (1999)

Esto a su vez conlleva que ocurra el proceso denominado vecería, que consiste en la alternancia entre años de elevada producción floral y frutal con años de escasa producción.

Se trata de un árbol perennifolio con copa ancha y tronco grueso de aspecto retorcido que puede alcanzar hasta 15 metros de altura. Sus flores de color blanco forman pequeños racimos y sus hojas de forma lanceolada pueden medir hasta 8 cm (Figura 23). De su fruto, la aceituna, se extrae el aceite de oliva, muy apreciado en gastronomía y que ha demostrado ampliamente poseer efectos beneficiosos para la salud humana<sup>7,97,129,130</sup>.

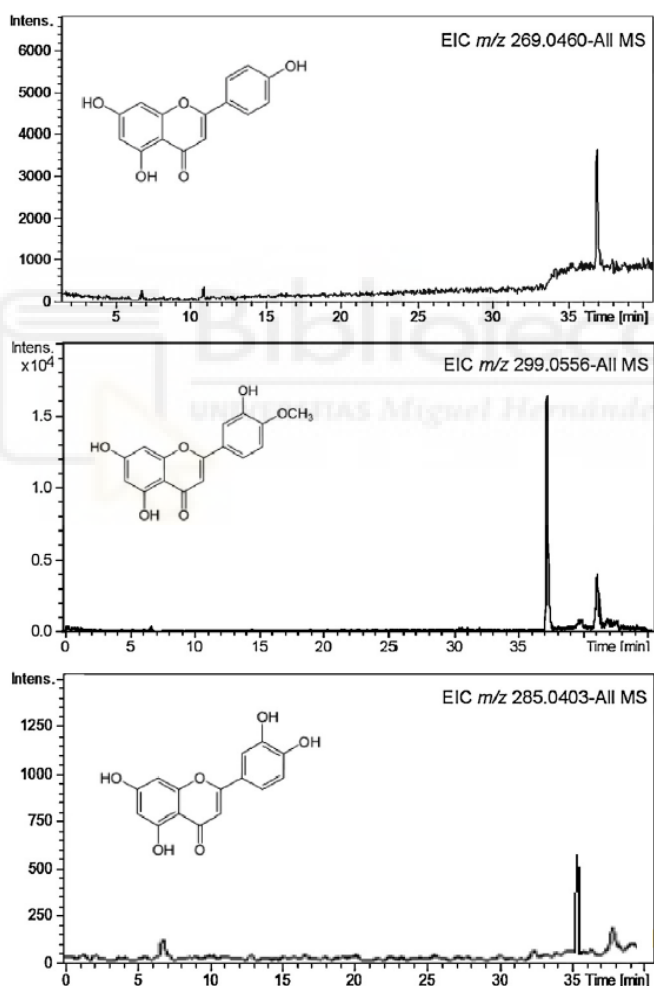
Sin embargo, es en sus hojas donde se encuentra la mayor concentración de compuestos bioactivos, y dado que son un desecho de la industria olivícola constituyen una materia prima de bajo coste y elevado interés para la búsqueda de nuevos tratamientos.



Figura 23. Detalle de la planta, flor, fruto y semilla de *Olea europaea*

Los **extractos de hoja olivo** han mostrado, entre otros muchos efectos, actividad antitumoral en diversos modelos de cáncer<sup>7,131-133</sup>. Además, los extractos de hoja de olivo también están obteniendo resultados positivos para el tratamiento de procesos relacionados con la obesidad, como el control de la presión sanguínea, la concentración de lípidos en plasma o los marcadores inflamatorios<sup>134</sup>, en cardiopreención<sup>135</sup> o en el tratamiento de la colitis crónica<sup>136</sup> entre otros.

En concreto, el extracto empleado en el presente trabajo ha sido probado con anterioridad en el modelo celular de cáncer de mama JIMT-1<sup>132</sup>. En los estudios previos, se demostró que, tras incubar células tumorales de cáncer de mama con el extracto, entre todos sus componentes, la **diosmetina** fue el metabolito intracelular más abundante, acompañado de cantidades menores de **apigenina** y **luteolina** (**Figura 24**). Sin embargo, el mayor efecto antiproliferativo del extracto completo en comparación con los compuestos aislados revela un potencial efecto sinérgico entre los tres compuestos identificados.



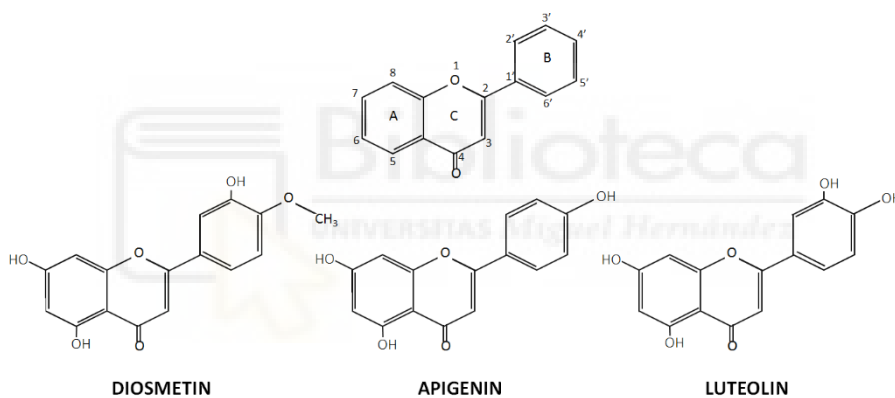
**Figura 24** Cromatogramas de iones extraídos (EIC) con estructuras moleculares de los metabolitos identificados en el citoplasma de células JIMT-1 tratadas con extracto de hoja de oliva SFE durante 72 h. – Fuente: Barrajón-Catalán *et al.* (2011)



Sobre estos compuestos existen estudios previos donde se ha estudiado el efecto sinérgico con otros compuestos tanto de origen natural como la curcumina<sup>137</sup> o la hidroxigenkwanina<sup>138</sup> como con compuestos quimioterápicos como la doxorubicina<sup>139</sup> o el 5-fluorouracilo, pero no se ha estudiado la posible potenciación entre ellos.

Los tres compuestos son polifenoles del grupo de las **flavonas** con dos grupos hidroxilos en el anillo A de la flavona, en los carbonos 6 y 7, y que difieren en los sustituyentes que presentan en los carbonos 3' y 4' del anillo B (**Figura 25**):

- Diosmetina: Grupo hidroxilo en C3' y metoxilo en C4'
- Apigenina: Grupo hidroxilo en C4'
- Luteolina: Grupos hidroxilos en C3' y C4'



**Figura 25.** Estructura general de los flavonoides y estructura de la diosmetina, apigenina y luteolina





Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 2. Hipótesis y Objetivos



Estudios preliminares realizados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis han mostrado el efecto antiproliferativo de un extracto de hoja de olivo en un modelo celular humano de cáncer de mama. En dichos estudios se evidenció que este efecto se debía principalmente a tres compuestos, diosmetina, apigenina y luteolina, ya que fueron hallados como metabolitos mayoritarios en el interior celular tras el tratamiento de las células con el extracto.

Por lo tanto, en esta tesis se han abordado dos objetivos principales, primero la optimización del extracto de hoja de olivo para aumentar la concentración de los principales principios activos, y segundo el estudio del efecto en diferentes modelos celulares de cáncer de mama de la mezcla de flavonas responsable del efecto antiproliferativo del extracto.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

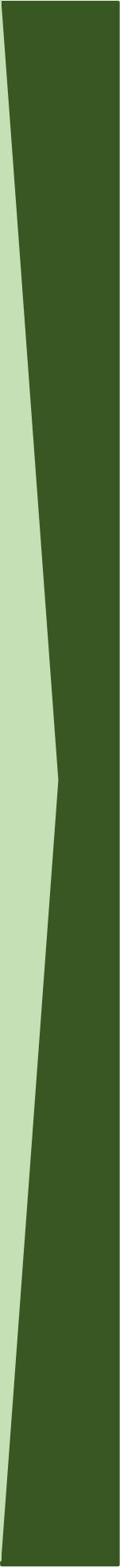
1. Valoración de los diferentes métodos de obtención del extracto y su influencia en la actividad biológica de los extractos obtenidos.
2. Determinación de los mecanismos de muerte del extracto en los diferentes subtipos de cáncer de mama:
  - 2.1. Cáncer de mama receptor de estrógenos positivo o luminal
  - 2.2. Cáncer de mama HER2 positivo
  - 2.3. Cáncer de mama Triple Negativo
  - 2.4. Metástasis cerebral de cáncer de mama Triple Negativo
3. Estudio de la absorción intestinal *in vitro* y del transporte a través de la barrera hematoencefálica mediante un modelo matemático
4. Estudio del posible efecto sinérgico de la capacidad antiproliferativa de la combinación de los principales compuestos del extracto.





Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

### 3. Metodología





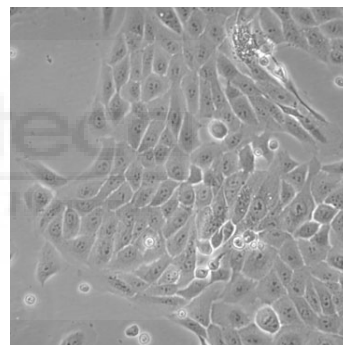


### 3.1. Líneas celulares y condiciones de mantenimiento

En este trabajo se han utilizado diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de mama, MCF7, JIMT-1, MDA-MB-231 y MDA-MB-231-BR, una línea de epitelio humano no tumoral, MCF10A, una línea de astrocitos humanos, THV, y una línea de adenocarcinoma de colon, Caco-2. Todas las líneas fueron subcultivadas 2-3 veces por semana empleando un tampón salino PBS al 1% y tripsina 0,25%. Todos los reactivos de cultivos fueron obtenidos de Gibco. Los detalles del cultivo de cada línea se exponen a continuación.

#### 3.1.1. MCF10A

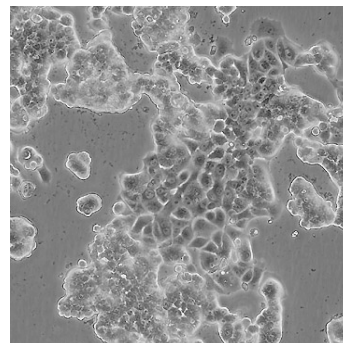
MCF10A es una línea celular obtenida a partir de tejido epitelial mamario de una mujer caucásica de 36 años con enfermedad fibroquística<sup>140</sup>. En este trabajo se ha utilizado como modelo de tejido mamario no tumoral. La línea celular se mantuvo con DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) alto en glucosa (4,5 g/L), suplementado con un 5% de suero equino, 0,1 µg/mL de toxina colérica, 20 ng/mL de hEGF, 10 µg/mL de insulina, 0,5 µg/mL de hidrocortisona y 50 U/mL de penicilina/estreptomicina (P/S).



**Figura 26.** Micrografía de la línea MCF10A – Fuente: ATCC

### 3.1.2.MCF7

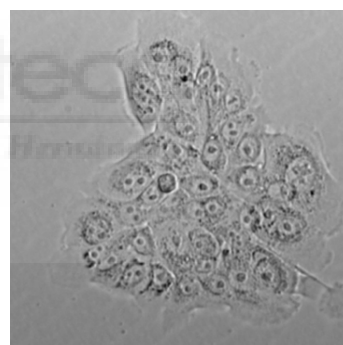
MCF7 es una línea celular obtenida a partir de un aspirado pleural de una mujer caucásica de 69 años con adenocarcinoma de mama luminal metastásico<sup>141</sup>. En este trabajo se ha utilizado como modelo de adenocarcinoma de mama humano del subtipo luminal y hormonodependiente. La línea celular se mantuvo con DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y 50 U/mL P/S.



**Figura 27.** Micrografía de la línea MCF7 – Fuente: ATCC

### 3.1.3.JIMT-1

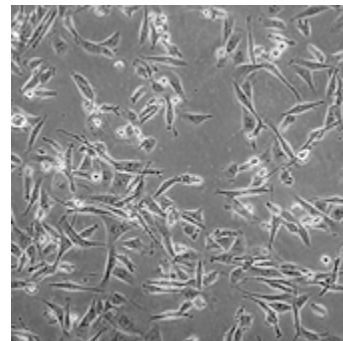
JIMT-1 es una línea celular obtenida a partir de un aspirado pleural de una mujer caucásica de 62 años con adenocarcinoma de mama HER2 metastásico y que presenta resistencia al tratamiento con trastuzumab<sup>142</sup>. En este trabajo se ha utilizado como modelo de adenocarcinoma de mama humano del subtipo HER2+. La línea celular se mantuvo con DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con 10% de SFB y 50 U/mL de P/S.



**Figura 28.** Micrografía de la línea JIMT-1 – Fuente: DSMZ

### 3.1.4.MDA-MB-231

MDA-MB-231 es una línea celular obtenida a partir de un aspirado pleural de una mujer caucásica de 51 años con adenocarcinoma de mama triple negativo metastásico<sup>143</sup>. En este trabajo se ha utilizado como modelo de adenocarcinoma de mama humano del subtipo TNBC. La línea celular se mantuvo con DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con 10% de SFB y 50 U/mL de P/S.



**Figura 29.** Micrografía de la línea MDA-MB-231 – Fuente: ATCC

### 3.1.5.THV

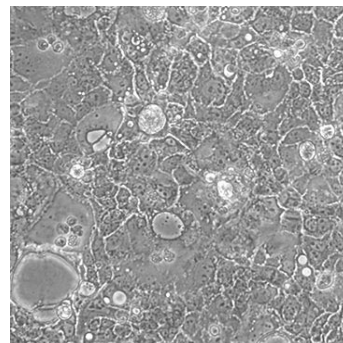
La línea celular THV proviene de astrocitos humanos inmortalizados mediante SV40 por el laboratorio de la Dra. Diana M. Cittelly. En este trabajo se ha utilizado como modelo de tejido cerebral sano. La línea celular se mantuvo con DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con un 10% de SFB y 50 U/mL de P/S.

### 3.1.6.MDA-MB-231-BR

La línea celular MDA-MB-231-BR es una subpoblación de la línea celular MDA-MB-231 obtenida de metástasis cerebrales inducidas en modelos animales con dicha línea por el Dr. Thoshiyuki Yoneda<sup>144</sup>. Se caracteriza por la preferencia trófica para desarrollar metástasis cerebrales. En este trabajo se ha utilizado como modelo de tumor metastásico cerebral desarrollado a partir de un TNBC. La línea celular se mantuvo con DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con 10% de SFB y 50 U/mL de P/S.

### 3.1.7.Caco-2

La línea celular Caco-2 proviene de células epiteliales de un hombre caucásico de 72 años con adenocarcinoma colorrectal<sup>145</sup>. En este trabajo se ha utilizado como modelo de epitelio intestinal en ensayos de absorción. La línea celular se mantuvo con DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con un 10% de SFB, un 1% de HEPES, un 1% de aminoácidos no esenciales y 50 U/mL de P/S.



**Figura 30.** Micrografía de la línea Caco-2 – Fuente: ATCC

## 3.2.Preparación de los tratamientos

Los extractos de hoja de olivo fueron disueltos en DMSO mientras que, debido a su hidrofobicidad, para la diosmetina, la apigenina y la luteolina (obtenidos de PhytoLab GmbH & Co. KG Vestenbergsgreuth, Alemania) se utilizó una mezcla de vehículos, DMSO:PBS:PEG400:TWEEN80 con la siguiente proporción: 70:15:12:3. Esta mezcla fue optimizada a partir de un vehículo utilizado previamente por el grupo de investigación<sup>146</sup>, para mejorar su solubilidad en medio acuoso.

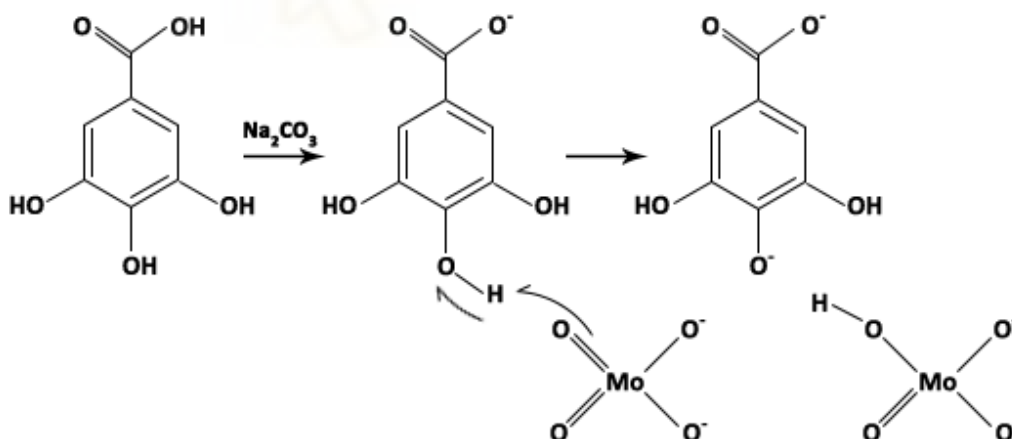
La mezcla de compuestos diosmetina, apigenina y luteolina se realizó en una ratio 5:1:1 (mg/g de extracto seco), correspondiente a la presente en el extracto de origen. En adelante, en el presente trabajo se denominará a dicha mezcla DAL511 y su concentración se expresará como la suma de concentraciones de los tres compuestos en  $\mu\text{M}$ .

### 3.3. Determinación del contenido fenólico

El ensayo Folin-Ciocalteu es un método colorimétrico utilizado en la determinación de compuestos fenólicos totales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico).

El ácido fosfomolibdowolfrámico formado por las dos sales en el medio ácido (amarillo) al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul (**Figura 31**) que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico.

Para el estudio de compuestos fenólicos en los extractos de hoja de olivo se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu reactivo con 10  $\mu\text{L}$  de muestra, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (p/v) y 840  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania), los resultados se expresaron como equivalentes en promedio de ácido gálico por 100 g de peso seco.



**Figura 31.** Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con el ácido gálico

### 3.4. Medida de la capacidad antioxidante

Para la medida de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de hoja de olivo se utilizaron dos métodos diferentes:

#### 3.4.1. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

El ensayo TEAC es una técnica colorimétrica que se basa en la inhibición de la absorbancia del catión radical de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), un cromóforo de color azul verdoso por parte de los antioxidantes. En primer lugar, se generan cationes radicales de  $ABTS^{+\bullet}$  mediante la incubación de la solución madre de ABTS con persulfato de potasio durante 12-24 horas a temperatura ambiente. A continuación, los antioxidantes pueden neutralizar estos cationes radicales mediante SET y HAT. Esto hace que el catión radical (cromóforo) vaya perdiendo coloración y por lo tanto se produzca la disminución de la absorción espectrofotométrica (Figura 32). Para el estudio de compuestos fenólicos primero se diluyó la solución  $ABTS^{+\bullet}$  con agua destilada hasta una absorbancia de 0.700 a 734 nm.

Para el ensayo espectrofotométrico se mezclaron 200  $\mu$ L de la solución  $ABTS^{+\bullet}$ , se realizó una medida de absorbancia inicial, se añadieron 20  $\mu$ L de solución del compuesto y se procedió a realizar una cinética midiendo absorbancia a 734 nm en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania). Los resultados se expresaron en milimoles equivalentes de Trolox por 100 g de compuesto.

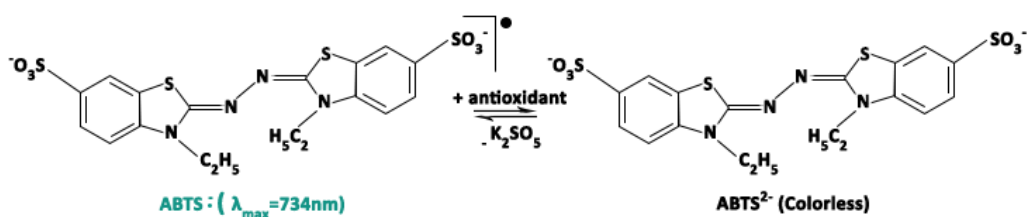


Figura 32 Reacción del reactivo ABTS

### 3.4.2. FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

El ensayo FRAP también se trata de un método espectrofotométrico y mide la reducción de un complejo formado por 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) e ion férrico  $\text{Fe}^{3+}$ , incoloro, a un complejo con ion ferroso  $\text{Fe}^{2+}$ , de un intenso color azul verdoso en presencia de antioxidantes en un medio ácido (**Figura 33**).

Para el estudio de los compuestos fenólicos se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP recién preparado con 40  $\mu\text{L}$  de agua destilada o 40  $\mu\text{L}$  de extracto y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. El reactivo FRAP contenía 2,5 mL de una solución 10 mM de TPTZ, 2,5 mL de cloruro férrico 20 mM y 25 mL de acetato de sodio 300 mM. La absorbancia se midió a 593 nm en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania). Se preparó una curva de calibración con diferentes concentraciones de  $\text{FeSO}_4$  (0-300  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresaron en milimoles equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$  por 100 g de compuesto.

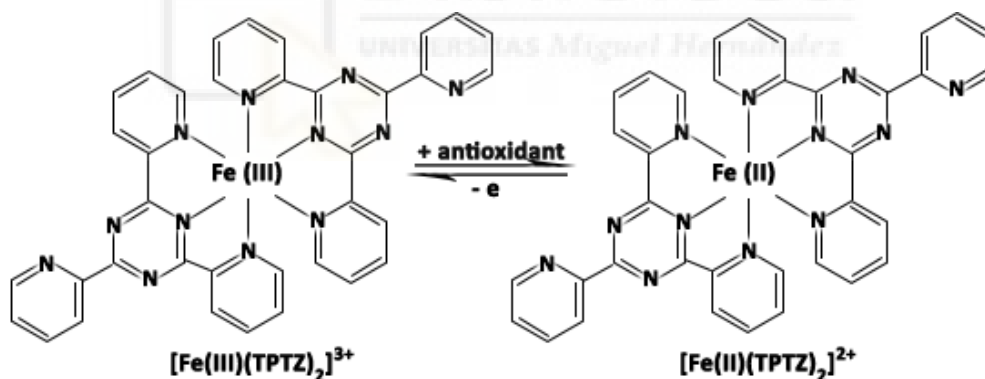


Figura 33. Reacción del reactivo TPTZ

## 3.5. Determinación de la viabilidad celular

### 3.5.1. Ensayo MTT

Este método se basa en la reducción de la sal de tetrazolio, Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), de color amarillo e hidrosoluble, en cristales de formazán de color púrpura e insolubles en agua (**Figura 34**). La enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa cataliza esta reacción y por lo tanto sólo ocurre en células con mitocondrias viables, es decir, en células vivas. El formazán se solubiliza en DMSO y la densidad óptica es medida espectrofotométricamente, de manera que la absorbancia es proporcional a la concentración de formazán y a su vez por lo tanto con el número de células metabólicamente viables en el cultivo.

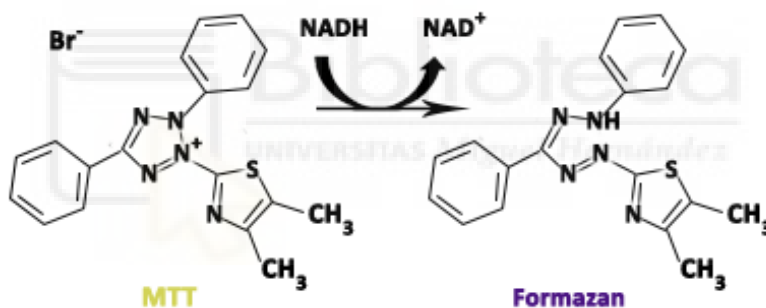


Figura 34. Reacción del reactivo MTT

Las células fueron sembradas a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y tratadas con los diferentes compuestos o con los extractos de hoja de olivo según las condiciones del ensayo. Una vez finalizado el tratamiento se agregó una solución del reactivo MTT disuelto en medio de cultivo completo (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó durante 3-5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.



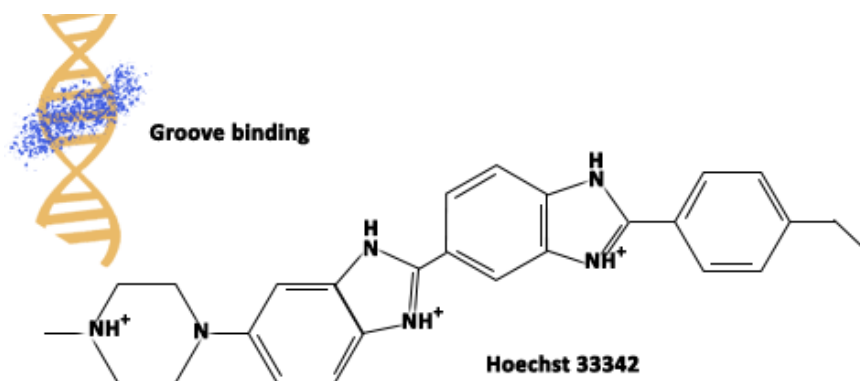
Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante de los pocillos y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO por pocillo para resuspender los cristales de formazán. Las placas se mantuvieron durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania) (**Figura 35**), empleando la absorbancia a 620 nm como referencia.



**Figura 35.** SPECTROstar Omega

### 3.5.2. Cuantificación de núcleos

Este método se basa en la tinción de los núcleos celulares con la sonda Hoechst 33342, una sonda permeable a la membrana plasmática, que se une al ADN, con mayor especificidad a los pares de bases A-T, y que emite fluorescencia (**Figura 36**).



**Figura 36.** Acción de la sonda Hoechst 33342

Las células fueron sembradas a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y tratadas con los diferentes compuestos o con los extractos de hoja de olivo según las condiciones del ensayo. Una vez finalizado el tratamiento se agregó la sonda Hoechst 33342 a  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de cultivo completo durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante de los pocillos, se lavaron con PBS y se procedió a medir la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 350 nm y 461 nm de emisión mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Alemania) (Figura 37).

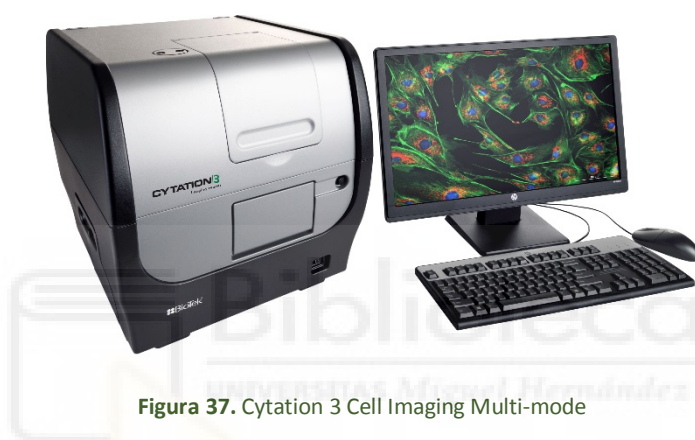


Figura 37. Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode

### 3.6. Análisis estadístico de composición y actividad

Para determinar los posibles compuestos responsables de las actividades biológicas estudiadas se llevó a cabo un análisis estadístico con el software R descartando las variables con más de 10 valores faltantes, en este caso la actividad antiproliferativa frente a MCF7. Las variables explicativas resultantes, la actividad antioxidante, por ambos métodos estudiados, y la actividad antiproliferativa frente a JIMT-1, se utilizaron para estimar las regresiones utilizando el modelo lineal generalizado (MLG).

### 3.7.Cálculo del índice terapéutico

Para determinar el índice terapéutico de DAL511 en los diferentes modelos de cáncer de mama se aplicó la **Ecuación 2**. Para ello se utilizaron las  $IC_{50}$  de las líneas tumorales como modelo de tejido enfermo y las  $IC_{50}$  de MCF10A para el tejido mamario y THV para el tejido cerebral como controles de tejido no tumoral.

### 3.8.Ensayos de proliferación, migración e invasión

#### 3.8.1.Ensayo de capacidad clonogénica

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la supervivencia se realizó un ensayo de formación de colonias (**Figura 38**). Para ello, las células fueron sembradas a una densidad de  $2 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones de la mezcla (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Pasadas 24 horas se retiró el tratamiento, se adicionó medio fresco y se incubaron las células durante 7 días a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . La adquisición de imágenes se realizó mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Alemania) con el objetivo 4x, 20 fotos por pocillo, y el conteo de colonias se realizó de manera manual y a ciegas, las fotos se codificaron para no conocer su tratamiento, en 10 fotos al azar por pocillo.

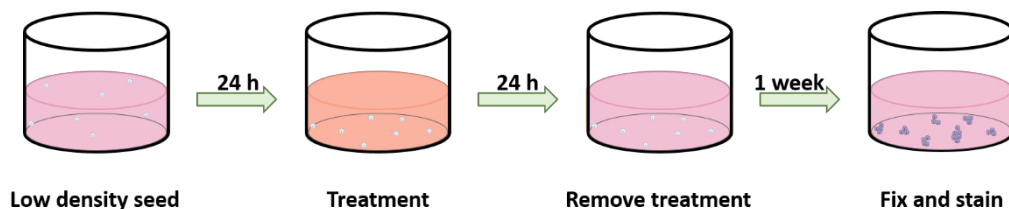


Figura 38. Ensayo de colonias

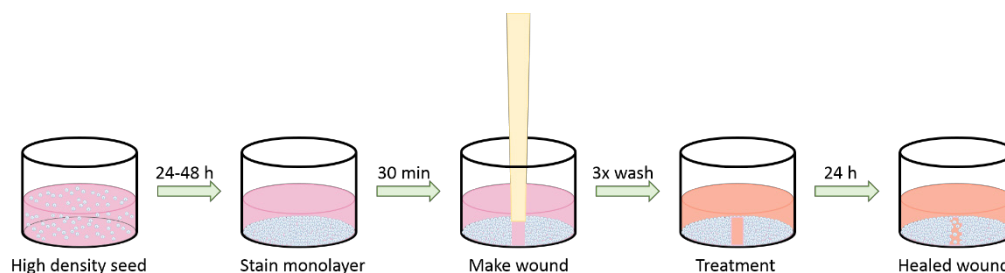
### 3.8.2. Ensayo de migración celular: “Wound healing”

Para determinar la capacidad de migración de las células se realizó el ensayo de cierre de herida (*del inglés wound healing*) (**Figura 39**), este se basa en la cuantificación del el área ocupada por las células que han migrado. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se esperó a que llegasen al 100% de confluencia. Se realizó una herida mediante una punta de micropipeta de 100  $\mu$ L en el centro del pocillo y se lavaron todos los pocillos con PBS.

A continuación, se tiñeron las células con la sonda fluorescente Hoechst 33342 durante 20 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este periodo, las células fueron tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (16,68-133,41  $\mu$ M) durante 24 horas. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Alemania) con un objetivo 20x y el área de la herida se cuantificó con el programa informático Image J 1.48v.

### 3.8.3. Ensayo de invasión celular: “Wound healing”

Para determinar la capacidad de invasión de las células se realizó el ensayo de cierre de herida con matrigel. Para ello, se pretrataron las placas con matrigel a 100  $\mu$ g/mL, tras 24 horas las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se esperó a que llegasen al 100% de confluencia.



**Figura 39.** Ensayo de migración celular “Wound healing”

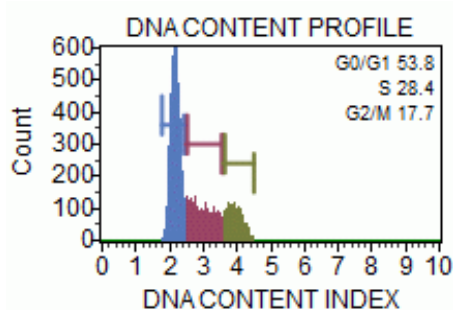
Se realizó una herida mediante una punta de micropipeta de 100  $\mu$ L en el centro del pocillo y se lavaron todos los pocillos con PBS. A continuación, se tiñeron las células con la sonda fluorescente Hoechst 33342 durante 20 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este periodo, las células fueron tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (16,68-133,41  $\mu$ M) preparadas en matrigel disuelto en DMEM a 4  $\mu$ g/mL durante 24 h.

La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Alemania) con un objetivo 20x y el área de la herida se cuantificó con el programa informático Image J 1.48v.

### 3.9. Análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante el estudio del contenido de ADN de las células, puesto que en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células este varía. Para ello se marcó el ADN con la sonda fluorescente yoduro de propidio, una sonda intercalante del ADN, emitiendo distinta intensidad de fluorescencia en función de su contenido de ADN (**Figura 40**).

Las células que se encuentran en la fase G2/M del ciclo celular ya han duplicado su material genético dando lugar a una señal de fluorescencia cuya intensidad duplica a la de las células que se encuentran en fase G1. La señal de las células que se encuentran en fase S se encuentra comprendida entre las que emiten las células en fase G1 y G2/M, ya que es durante esta fase cuando se comienza a duplicar el material genético.



**Figura 40.** Histogramas del contenido de ADN – Fuente: Merck Millipore

Por otra parte, las células apoptóticas (fase sub-G1) presentan fragmentación del ADN y por ello emiten menor fluorescencia que las células en fase G1 que tienen el ADN íntegro.

Las células fueron sembradas a una densidad de  $2,1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Tras finalizar el tratamiento, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se fijaron con etanol frío al 75% durante 24 horas a  $-20^\circ\text{C}$ . Tras la fijación, las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y se procedió al marcaje fluorescente del ADN añadiendo 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Muse Cell Cycle Kit (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos), incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. A continuación, se determinó la distribución de las fases del ciclo celular mediante la adquisición de los datos de fluorescencia empleando la tecnología del equipo Muse Cell Analyzer (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos) (Figura 41).



Figura 41. Muse Cell Analyzer

### 3.10. Detección de apoptosis mediante Anexina-V

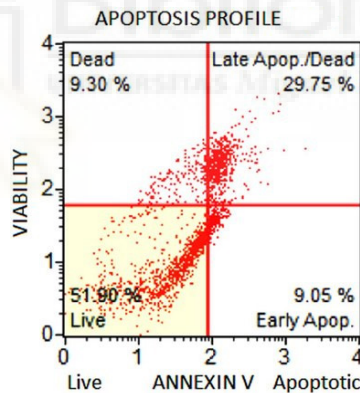
La pérdida de la asimetría de membrana es un fenómeno universal y característico de la muerte celular por apoptosis. Las células apoptóticas se pueden detectar marcando las células con Anexina-V, ya que esta se une a los restos de FS que, aunque en situación normal no son accesibles, son expuestos al exterior durante el proceso apoptótico.

Además, se añade la sonda 7-aminoactinomicina D (7-AAD), la cual entra en las células que han perdido la integridad de la membrana tal y como ocurre en las células necróticas para poder discernir entre las células en apoptosis tardía y las necróticas.

En un gráfico de resultados tipo, aparecerá en el eje X la fluorescencia de la Anexina-V y en el eje Y la fluorescencia correspondiente a la 7-AAD.

De manera que según el cuadrante en el que se encuentre la población celular se corresponderá con una de las siguientes situaciones (**Figura 42**):

- Cuadrante inferior izquierdo (Anexina-V -, 7-AAD -): células sanas
- Cuadrante inferior derecho (Anexina-V +, 7-AAD -): células en apoptosis temprana
- Cuadrante superior derecho (Anexina-V +, 7-AAD +): células en apoptosis tardía/necróticas
- Cuadrante superior izquierdo (Anexina-V -, 7-AAD +): células necróticas



**Figura 42.** Ejemplo de distribución de la población en los cuadrantes del ensayo Anexina-V

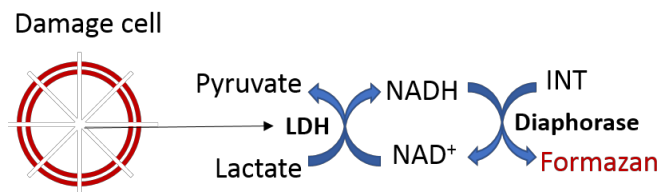
Las células fueron sembradas a una densidad de  $2,1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Tras finalizar el tratamiento, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Muse Annexin V & Dead Cell Kit (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

A continuación, se determinó el porcentaje de apoptosis mediante la adquisición de los datos de fluorescencia empleando la tecnología del equipo Muse Cell Analyzer (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos).

### 3.11. Determinación de la integridad de la membrana plasmática

La integridad de la membrana plasmática, que se ve afectada en las células necróticas, se determinó mediante la medida de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima estable, presente en el citosol de todas las células y la cual es liberada rápidamente al exterior cuando existe daño en la membrana plasmática.

Para ello se empleó el kit de citotoxicidad LDH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), por el cual la medición de la actividad de la enzima LDH se lleva a cabo utilizando una mezcla de reactivos que contiene lactato (sustrato),  $\text{NAD}^+$  (cofactor), otra enzima con actividad diaforasa y la sal de tetrazolio INT (cloruro de iodonitrotrifenil tetrazolio). La LDH cataliza la reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH en presencia de L-lactato. Esta formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolio INT se reduce a un producto de formazán rojo, que se puede medir por espectrofotometría (**Figura 43**).



**Figura 43.** Reacción colorimétrica del ensayo de LDH

Las células fueron sembradas a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas.



Tras finalizar el tratamiento, se aspiraron 100 µL de sobrenadante y se transfirieron a otra placa. A continuación, se realizó el ensayo de actividad LDH empleando el sobrenadante y los reactivos descritos previamente.

Las placas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, después se midió la absorbancia en un lector de placas a 492 nm (filtro de referencia 600 nm) en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{Control negativo}}{\text{Control positivo} - \text{Control negativo}} \times 100$$

Ecuación 5. Cálculo de la citotoxicidad mediante cuantificación de LDH

Los datos fueron analizados, tomando como 100% de liberación de LDH los pocillos tratados con el tampón de lisis (control positivo) y como 0% de muerte celular los pocillos tratados con el vehículo (control negativo).

### 3.12. Determinación de necroptosis y autofagia

Para determinar el tipo de muerte celular provocada por DAL511, se empleó la necrostatina-1 (inhibidor de la necroptosis) y la cloroquina (inhibidor de la autofagia).

Las células fueron sembradas a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y pretratadas con 10 µM de necrostatina-1 y 10 µM de cloroquina, de manera independiente, durante las dos horas previas al tratamiento realizado con los compuestos (33,35-133,41 µM) durante 24 horas.

Como control se sembraron y trataron en las mismas condiciones, excepto el pretratamiento con el inhibidor correspondiente, sendas placas. Una vez finalizado el tratamiento, se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

### 3.13. Medición del Potencial de Membrana Mitocondrial

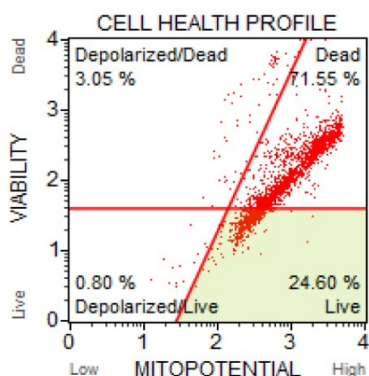
La pérdida del potencial de membrana mitocondrial fue analizada mediante dos métodos: (a) Muse Cell Analyzer (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos) y (b) microscopía de fluorescencia.

#### 3.13.1. Muse Cell Analyzer

Para determinar el PMM se utilizó una sonda catiónica lipofílica (SCL) que penetra en la mitocondria solo cuando su membrana se encuentra despolarizada y la sonda 7-AAD para la viabilidad celular.

En un gráfico de resultados tipo, aparecerá en el eje X la fluorescencia de la sonda dependiente del PMM y en el eje Y la fluorescencia correspondiente a la 7-AAD. De manera que según el cuadrante en el que se encuentre la población celular se corresponderá con una de las siguientes situaciones (**Figura 44**):

- Cuadrante inferior izquierdo (SCL -, 7-AAD -): células sanas
- Cuadrante inferior derecho (SCL +, 7-AAD -): células vivas despolarizadas
- Cuadrante superior derecho (SCL +, 7-AAD +): células muertas despolarizadas
- Cuadrante superior izquierdo (SCL -, 7-AAD+): células muertas polarizadas



**Figura 44.** Ejemplo de distribución de la población en los cuadrantes del ensayo de mitopotencial

Las células fueron sembradas a una densidad de  $2,1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ). Tras finalizar el tratamiento se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se añadieron 195  $\mu\text{L}$  del reactivo Muse Mitopotential Kit (Millipore, Hayward, CA, USA), y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de la sonda 7-AAD y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se determinó el porcentaje de células despolarizadas mediante la adquisición de los datos de fluorescencia empleando la tecnología del equipo Muse Cell Analyzer (Millipore, Hayward, CA, USA).

### 3.13.2. Microscopía de fluorescencia

El compuesto fluorescente MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, Invitrogen, Europa) se introduce en las mitocondrias activas que conservan el PMM quedando retenido. Por el contrario, el compuesto fluorescente MitoTracker Green FM (Molecular Probes, Invitrogen, Europa) se introduce en las mitocondrias independientemente del potencial de membrana mitocondrial por lo que tiñe la masa mitocondrial al completo. De manera que se pueden distinguir por microscopía de fluorescencia las células que con pérdida del PMM de aquellas que lo conservan.

Las células fueron sembradas a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ). Tras finalizar el tratamiento las células se lavaron con PBS y se incubaron con 200 nM de MitoTracker Red CMXRos y 200 nM de MitoTracker Green durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Finalmente, la fluorescencia se cuantificó mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Alemania). La relación obtenida de la señal de fluorescencia fue normalizada con la cuantificación del número de núcleos mediante la tinción fluorescente Hoechst.

### 3.14. Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

La generación de ROS fue detectada con la sonda fluorescente 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato ( $H_2DCF\text{-}DA$ ). Se trata de una sonda fluorescente que mide la presencia de los radicales hidroxilo, peroxilo y otras ROS dentro de la célula. Después de la difusión al interior celular, los grupos acetilo se escinden por acción de la esterasa intracelular para producir el compuesto no fluorescente que es oxidado rápidamente por las ROS dando lugar a un compuesto fluorescente (**Figura 45**). La intensidad de la fluorescencia es proporcional a los niveles de ROS citosólicos.

Las células fueron sembradas a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos y tratadas con DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ). Tras finalizar el tratamiento, las células se incubaron con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $H_2DCF\text{-}DA$  durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Pasado este tiempo, se aspiró el contenido de los pocillos, se lavaron con PBS y se procedió a medir la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Alemania). La señal de fluorescencia fue normalizada mediante la cuantificación del número de núcleos mediante la tinción fluorescente Hoechst 33342.

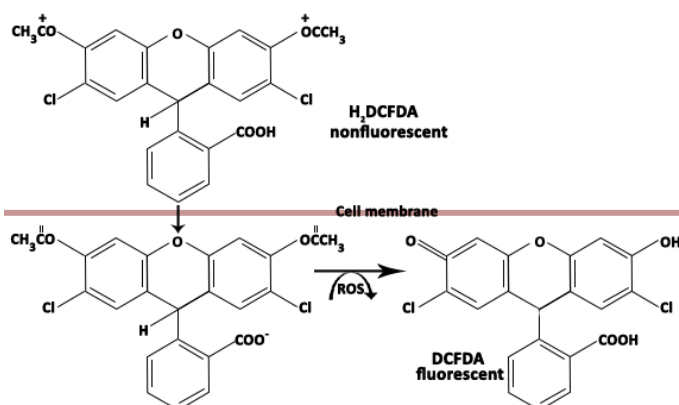


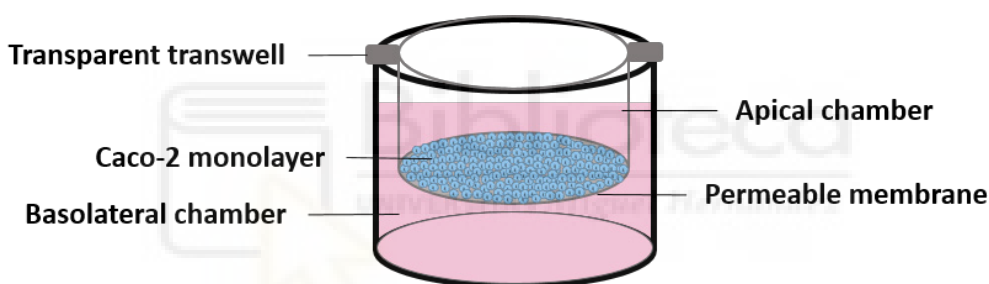
Figura 45. Reacción de la sonda  $H_2DCF\text{-}DA$  – Fuente: Modificada de Chin *et al.* (2011)

## 3.15. Absorción intestinal *in vitro*

### 3.15.1. Obtención de muestras

Para determinar la absorción intestinal de la mezcla DAL511 se utilizó la línea celular Caco-2. El ensayo de absorción intestinal *in vitro* mediante esta línea celular es un modelo ampliamente aceptado y utilizado<sup>147</sup>.

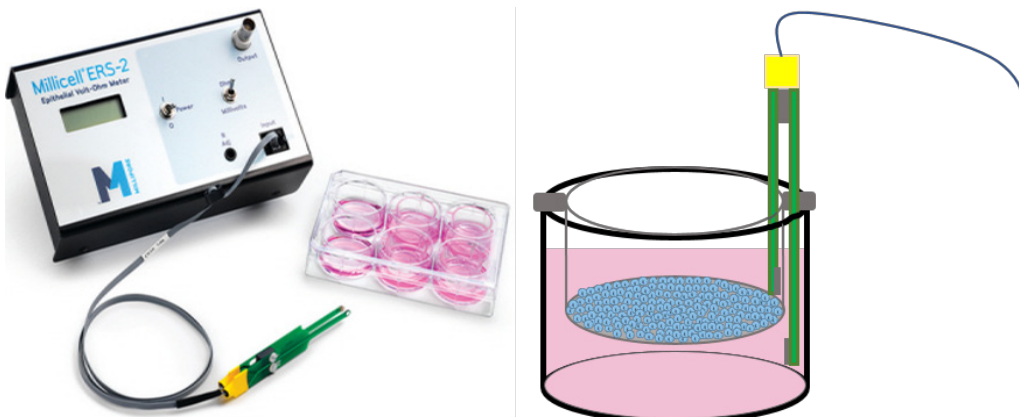
Las células fueron sembradas en insertos de policarbonato (Millipore, España) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo y en placas de 6 pocillos. El medio de cultivo se reemplazó 3 veces por semana tanto en la cámara apical (AP) como en la cámara basolateral (BL) (Figura 46).



**Figura 46.** Esquema del modelo de absorción formado por el inserto de policarbonato y la monocapa celular de Caco-2

Una vez alcanzados los 19-21 días post-siembr, se determinó la integridad de la monocapa mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) utilizando un micro-polímetro (Millicell-ERS, Millipore, España) (Figura 47), que mide el potencial de membrana y la resistencia de las células en cultivo. A continuación, las células se trataron con la mezcla DAL511 a  $33,35 \mu\text{M}$  en tampón HBSS (pH 7,4).

Las monocapas celulares se lavaron dos veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) atemperado a  $37^\circ\text{C}$  y se incubaron con dicha disolución a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. El tratamiento se añadió al compartimento correspondiente para la cámara AP (2,2 mL) y para la cámara BL (3,2 mL).



**Figura 47.** Representación de la medida del TEER

Se recogieron muestras a diferentes tiempos (0, 30, 60, 90 y 120 minutos) en la cámara receptora y se repuso el mismo volumen de muestra recogida, 200  $\mu$ L. La incubación a lo largo del experimento se realizó a 37°C a 54 rpm.

Al finalizar el ensayo se extrajo la monocapa y las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se obtuvieron dos fracciones: (a) los sobrenadantes (fracción citoplasmática) y (b) los precipitados (membranas) disueltos en etanol.

Todas las muestras se liofilizaron, se disolvieron en 100  $\mu$ L de metanol para su concentración y se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

### 3.15.2. Análisis de muestras por HPLC

Las muestras procedentes del ensayo de permeabilidad realizado en monocapas de células Caco-2 se analizaron mediante un cromatógrafo HPLC Agilent serie LC 1100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.) El equipo es controlado por el software ChemStation y está equipado con una bomba, un inyector automático, un compartimento termostatzado de columna y un detector de diodos UV-Vis.

La columna empleada para la separación de los compuestos fue una columna Poroshell 120 SB-C18, de dimensiones 4,6 x 150 mm y tamaño de partícula de 2,7 µm. La fase móvil utilizada consistió en 2,5% de ácido acético en agua como solvente A y acetonitrilo como solvente B. El gradiente empleado fue: 0 min, 30% de B; 6 min, 60% de B; 9 min, 100% de B; 13 min, 100% de B; 17 min, 60% de B y 20 min, 30% de B. El flujo fue de 0,5 mL/min y el compartimento de las muestras se refrigeró a 4°C para evitar la degradación de las muestras.

La adquisición y análisis de los datos se llevó a cabo mediante el programa informático ChemStation (Agilent Technologies, Estados Unidos). Las evaluaciones cuantitativas de la concentración de diosmetina, apigenina y luteolina se realizaron utilizando la línea de calibración correspondiente de cada compuesto con una curva de regresión de ocho puntos ( $r^2 > 0.997$ ).

### 3.15.3. Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente

( $P_{app}$ )

Una vez cuantificadas las concentraciones de todos los compuestos identificados en las muestras derivadas de la cámara AP y BL, se utilizaron dichos valores para calcular la  $P_{app}$ .

Dicho parámetro fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{1}{A * C_0 * 60}$$

**Ecuación 6.** Cálculo del coeficiente de la permeabilidad aparente

Donde  $P_{app}$  es la permeabilidad aparente (cm/s),  $dQ/dt$  representa el flujo másico de paso (µM/s),  $A$  es el área de difusión de la monocapa (cm<sup>2</sup>),  $C_0$  es la concentración inicial del compuesto en la cámara dadora (µM) y **60** es un factor de conversión<sup>148</sup>.

Además, se puede estimar el tipo de transporte calculando el Efflux ratio (Er) o flujo de salida (eflujo) mediante la siguiente fórmula:

$$Er = \frac{P_{app} \text{ BL} \rightarrow \text{ AP}}{P_{app} \text{ AP} \rightarrow \text{ BL}}$$

**Ecuación 7.** Cálculo del Efflux ratio

Los valores de  $Er < 0,5$  se corresponden a transporte activo, los valores  $0,5 < Er < 2$  a difusión pasiva y los valores  $Er > 2$  a eflujo.

### 3.16. Absorción hematoencefálica derivada de la $P_{app}$

A partir de los valores de  $P_{app}$  del ensayo de absorción con Caco-2 se puede calcular un parámetro, la permeabilidad activa  $P_{active}$ , que debido a la buena correlación entre dicho parámetro y la tasa de permeación de la BHE *in situ*, medida como el logaritmo del producto de la permeabilidad por la superficie o  $\log PS$ , permite evaluar indirectamente la absorción de un compuesto por la BHE, siempre que los compuestos no presenten eflujo, es decir, que el efflux ratio sea inferior a 2 (**Figura 48**). El cálculo del  $P_{active}$  a partir del  $P_{app}$  se realiza con la siguiente fórmula:

$$P_{active} = \frac{P_{app} \text{ BL} \rightarrow \text{ AP} - P_{app} \text{ AP} \rightarrow \text{ BL}}{2}$$

**Ecuación 8.** Cálculo de la permeabilidad activa



### 3.17. Estudio de la sinergia entre diosmetina, apigenina y luteolina

Para el estudio de sinergia entre los compuestos diosmetina, apigenina y luteolina primero se estudiaron las interacciones entre los compuestos en mezclas por parejas y después entre la mezcla triple. Puesto que la actividad a comparar es la actividad antiproliferativa se determinó la viabilidad celular por MTT, siguiendo el esquema de diseño de placas mostrado en la **Figura 48**.

Para determinar la actividad de las distintas combinaciones, se realizó un ensayo MTT para cada una de éstas. Se sembraron placas de 96 pocillos de cada línea celular, MCF7 y JIMT-1, para cada combinación, utilizando diferentes rangos de concentraciones.

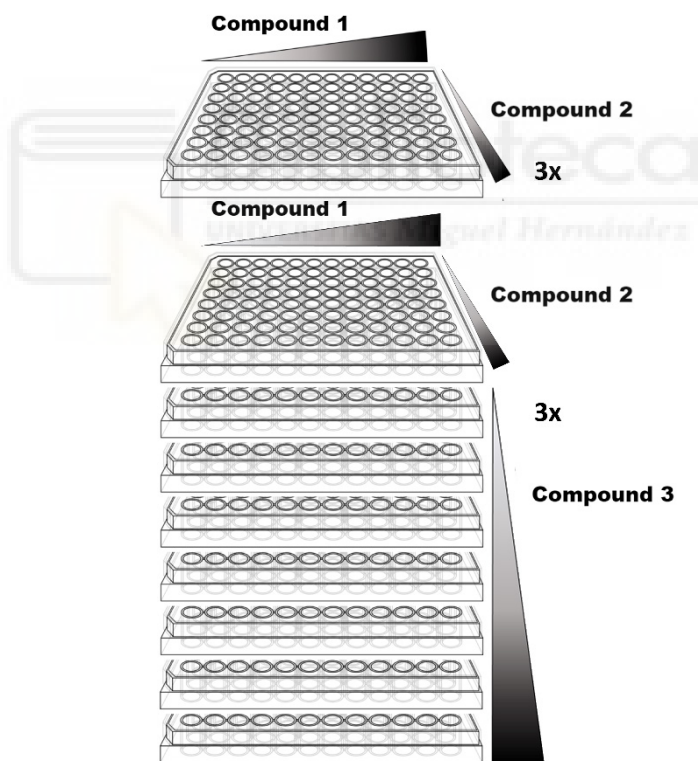
Las concentraciones fueron elegidas teniendo en cuenta las  $IC_{50}$  de los compuestos por separado, la toxicidad del vehículo y la ratio presente en el extracto de hoja de olivo original. En cada placa, además de las distintas combinaciones entre los dos compuestos, se añadió un control de la actividad de cada uno de los compuestos por separado. A las 24 horas tras el tratamiento se siguió el procedimiento anteriormente descrito para el ensayo MTT. Este ensayo se realizó con 3 réplicas por condición, estando cada réplica en placas independientes.

Se determinó el tipo de interacción entre los distintos compuestos mediante el cálculo de los valores de FICI a partir de los valores de  $IC_{50}$  previamente calculados, y la representación de los isobogramas.

Esta se realizó utilizando Microsoft Excel (Microsoft Excel 2010, Microsoft Corporation, USA) a partir de los valores de  $IC_{50}$  de los compuestos por separados y en la mezcla, en diferentes ratios de concentración.

Posteriormente, se determinó la interacción entre los compuestos mediante el software Compusyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ. USA, 2005), programa específico para la búsqueda de interacciones (sinergia, aditividad o antagonismo) entre distintos compuestos dentro del contexto de una actividad farmacológica concreta. El software Compusyn calcula el índice de combinación CI a partir de los valores de concentración de la mezcla de compuestos, la ratio y el efecto observado en cada caso para diferentes fracciones afectadas o  $F_a$ , equivalente a la inhibición de la proliferación celular, en comparación con los valores de efecto de los compuestos por separado.

De esta forma, es posible comparar los resultados obtenidos mediante métodos tradicionales, como son el cálculo de FICI y los isoblogramas, con el software especializado para la búsqueda de sinergia Compusyn.



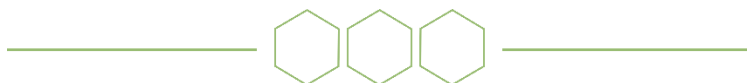
**Figura 48.** Esquema de placa para los ensayos de sinergia con combinaciones dobles (superior), y triples (inferior). La concentración de cada compuesto de la combinación se aumentó en una dirección del espacio, por ello para la combinación triple fue necesario incluir un mayor número de placas.- Fuente: Modificada de Herranz-López *et al.* (2019)



**Bibliotecas**  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

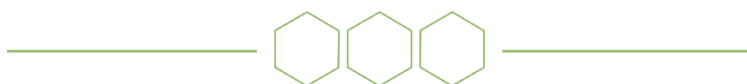
## 4. Resultados





# Capítulo I:

**Optimización de la capacidad  
antioxidante y antiproliferativa  
de un extracto de hoja de olivo**





En el presente capítulo se llevó a cabo la evaluación de la optimización del método de extracción del extracto de hoja de olivo. Para ello se analizaron 30 extractos preparados con hojas recogidas en las diferentes estaciones del año y secadas a diferentes temperaturas. Los extractos y su composición analizada por HPLC-ESI-TOF-MS fueron proporcionados por los grupos de la Dra. Taamalli (Laboratoire de Biotechnologie de l'Olivier, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria, Túnez) y el Dr. Segura-Carretero (Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional, Granada).

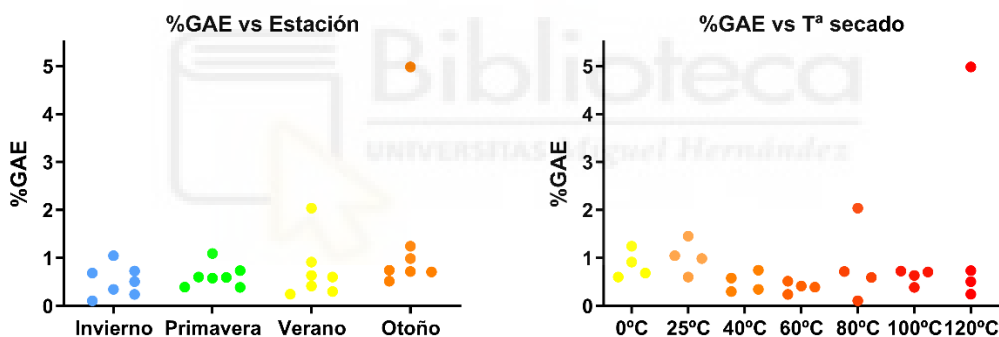
Las condiciones de secado y obtención de las muestras se recogen, junto con otros resultados que se comentarán más adelante, en la **Tabla 5**. Los parámetros estudiados fueron el contenido fenólico, la capacidad antioxidante y la capacidad antiproliferativa en dos líneas celulares humanas de cáncer de mama.

No se obtuvo ningún extracto que mejorase los resultados de actividad antiproliferativa del extracto de origen, por ello se consideró fallida la optimización en el proceso de extracción y se continuó el estudio del mecanismo de muerte celular con la combinación de los compuestos responsables de la actividad, diosmetina, apigenina y luteolina.

## 4.1. Determinación del contenido fenólico

El contenido fenólico fue el primer parámetro estudiado ya que se buscaba obtener un extracto enriquecido en polifenoles por ser estos los principales responsables de las actividades antioxidantes y antiproliferativa.

Los resultados más altos de contenido fenólico obtenidos (**Figura 49 y Tabla 5**) fueron, de manera individual, los del extracto D7A (Otoño, 120°C) con un %GAE de  $4,98 \pm 0,25$ , seguido de C5A (Verano, 80°C) con  $2,04 \pm 0,4$  y por B2RA (Primavera, 25°C) con  $1,45 \pm 0,03$ . Cuando se tienen en cuenta los datos agrupados por estación, los mejores resultados fueron por orden otoño, verano, primavera e invierno y cuando se agrupan por la temperatura de secado, los rangos superiores a 80°C parecieron favorecer el aumento en algunos casos aunque no es una mejora constante.



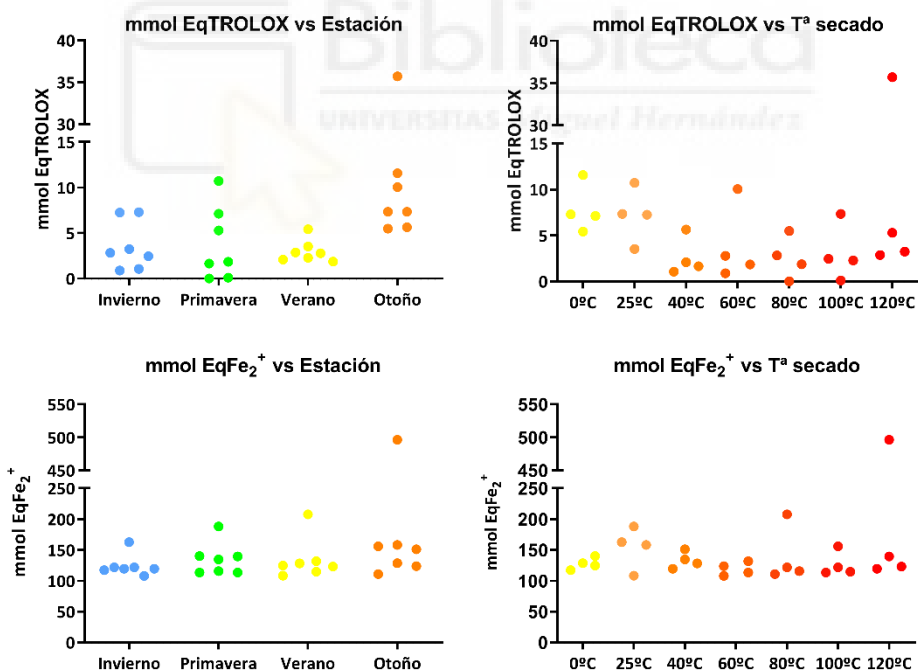
**Figura 49.** Resultados del contenido fenólico en función de la estación de recogida y de la temperatura de secado. Los datos son expresados como la media ( $n=3$ ) del porcentaje de equivalentes de ácido gálico por 100 g para cada extracto.



## 4.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Los resultados más altos de capacidad antioxidante obtenidos para el ensayo TEAC fueron del extracto D7A (Otoño, 120°C) con  $32,75 \pm 6,34$  mmol EqTROLOX seguido de C5A (Verano, 80°C) con  $14,60 \pm 1,94$  mmol EqTROLOX y de B2A (Primavera, 25°C) con  $11,99 \pm 0,52$  mmol EqTROLOX. Para el ensayo de FRAP fueron D7A (Otoño, 120°C) con  $495,40 \pm 2,17$  mmol EqFe<sub>2</sub><sup>+</sup> seguidos de C5A (Verano, 80°C) con  $208 \pm 1,71$  mmol EqFe<sub>2</sub><sup>+</sup> y por B2A (Primavera, 25°C) con  $188,14 \pm 1,36$  mmol EqFe<sub>2</sub><sup>+</sup> (**Figura 50 y Tabla 5**).

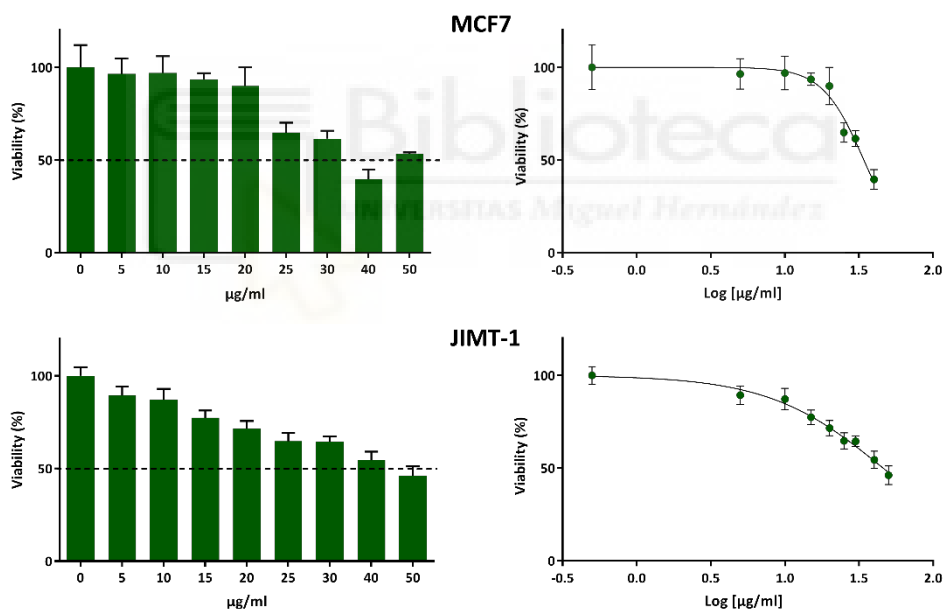
De esta manera, los resultados se corresponden entre ambos ensayos antioxidantes, también con los resultados para el contenido fenólico, siendo las mejores condiciones de recogida por orden otoño, verano, primavera e invierno. En cuanto al aumento de la temperatura de secado los resultados no muestran una tendencia que permita determinar las condiciones óptimas.



**Figura 50.** Resultados de la capacidad antioxidante en función de la estación de recogida y de la temperatura de secado. Los datos son expresados como la media (n=3) de mmol equivalentes de trolox y de Fe<sup>2+</sup> por 100 g para cada extracto.

### 4.3. Determinación de la viabilidad en modelos celulares

Para determinar la viabilidad se trataron las diferentes líneas con un rango de concentraciones de 0-50  $\mu\text{g/mL}$  teniendo en cuenta el valor previo con el extracto de origen, 7  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, en la mayoría de casos ni siquiera se pudo calcular la  $\text{IC}_{50}$  y los valores más bajos obtenidos fueron de  $40,78 \pm 4,81 \mu\text{g/mL}$  en MCF7 y de  $45,93 \pm 3,84 \mu\text{g/mL}$  en JIMT-1 para el extracto C5A (Verano, 80°C), como se observa en la **Figura 51** y la **Tabla 5**. No se aumentaron las concentraciones probadas para obtener todos los valores de  $\text{IC}_{50}$  ya que los obtenidos a las concentraciones probadas eran muy superiores a lo esperado y no se consideró necesario.



**Figura 51.** Efecto del extracto C5A en la línea de cáncer de mama luminal MCF7 y HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones del extracto (0-50  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%).

Extracto	Estación de recogida	Invierno										Primavera					
		A1A	A2A	A3A	A4A	A5A	A6A	A7A	B1A	B2A	B3A	B4A	B5A	B6A	B7A		
Tª de secado (C°)	Fresco		25	40	60	80	100	120	Fresco	25	40	60	80	100	120		
%GAE	0,69 ± 0,05	1,05 ± 0,09	0,34 ± 0,05	0,24 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,73 ± 0,08	0,51 ± 0,00	0,60 ± 0,02	1,45 ± 0,03	0,58 ± 0,08	0,39 ± 0,04	0,59 ± 0,07	0,39 ± 0,05	0,74 ± 0,03			
mmol EqTROLOX	7,71 ± 1,04	7,68 ± 0,87	1,48 ± 0,13	1,31 ± 0,14	3,25 ± 0,54	2,88 ± 0,77	3,65 ± 0,67	7,54 ± 1,45	11,99 ± 0,52	2,06 ± 0,99	2,25 ± 0,23	1,99 ± 0,12	2,07 ± 0,70	9,71 ± 0,28			
mmol EqFe <sup>2+</sup>	117,13 ± 0,59	162,71 ± 0,05	119,47 ± 0,08	108,02 ± 0,31	121,89 ± 1,38	121,74 ± 2,19	119,55 ± 3,34	145,31 ± 1,57	188,14 ± 1,36	134,69 ± 0,21	113,52 ± 1,16	115,24 ± 1,18	113,65 ± 0,37	139,02 ± 1,18			
IC <sub>50</sub> MCF7	*	*	*	*	*	*	*	56,58 ± 8,59	53,43 ± 5,20	*	*	*	*	*			
IC <sub>50</sub> JIMT-1	67,84 ± 15,74	*	*	*	*	*	*	71,75 ± 22,77	*	*	*	*	*	*			

Tabla 5. Condiciones de extracción y resultados de FOLIN, TEAC, FRAP y MTT para los 30 extractos de hoja de olivo

Extracto	Estación de recogida	Verano										Otoño					
		C1A	C2A	C3A	C4A	C5A	C6A	C7A	D1A	D2A	D3A	D4A	D5A	D6A	D7A		
Tª de secado (C°)	Fresco		25	40	60	80	100	120	Fresco	25	40	60	80	100	120		
%GAE	0,91 ± 0,07	0,61 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,42 ± 0,06	2,04 ± 0,40	0,63 ± 0,02	0,25 ± 0,02	1,24 ± 0,03	0,99 ± 0,15	0,74 ± 0,03	0,52 ± 0,06	0,72 ± 0,06	0,71 ± 0,07	4,98 ± 0,25			
mmol EqTROLOX	6,51 ± 2,17	3,94 ± 0,73	2,51 ± 1,12	3,20 ± 0,53	14,88 ± 1,94	4,72 ± 1,80	5,78 ± 0,15	11,98 ± 1,40	7,74 ± 0,90	6,06 ± 1,78	9,20 ± 1,38	6,56 ± 1,21	9,41 ± 2,33	33,17 ± 6,53			
mmol EqFe <sup>2+</sup>	125,31 ± 2,01	108,15 ± 0,90	108,27 ± 0,10	127,87 ± 3,04	208,00 ± 1,71	114,80 ± 2,07	123,07 ± 0,44	128,68 ± 0,42	158,08 ± 0,68	151,21 ± 0,90	127,49 ± 2,86	110,98 ± 3,81	139,58 ± 0,81	495,40 ± 2,17			
IC <sub>50</sub> MCF7	*	*	*	*	40,78 ± 4,81	*	*	60,39 ± 6,47	*	91,09 ± 28,55	46,23 ± 2,84	*	*	*			
IC <sub>50</sub> JIMT-1	*	*	*	*	45,93 ± 3,84	*	*	69,55 ± 19,68	*	66,02 ± 9,11	104,80 ± 21,17	*	107,09 ± 38,99	*			

Tabla 5. Condiciones de extracción y resultados de FOLIN, TEAC, FRAP y MTT para los 30 extractos de hoja de olivo

## 4.4. Búsqueda estadística de posibles candidatos responsables de las actividades de los extractos

En paralelo a la realización del presente trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF), responsable de la elaboración de los extractos, se llevó a cabo la caracterización de los extractos (**Tabla 9**)<sup>149</sup>.

En base a dicha caracterización se realizó un análisis estadístico para determinar los compuestos candidatos de ser responsables de las actividades antioxidante y antiproliferativa de los extractos mediante un modelo lineal generalizado.

Respecto a la actividad antioxidante se analizaron por separado los resultados de TEAC y de FRAP. Respecto a los resultados de TEAC se estimó que el candidato que más contribuye la actividad antioxidante es el isómero 1 de oleuropeína con una significancia de  $p < 0,001$  (**Tabla 6**). En cuanto a los resultados de FRAP se estimó que el candidato es la vainillina con una significancia de  $p < 0,001$  (**Tabla 7**).

Para la actividad antiproliferativa solo se analizaron los datos obtenidos en la línea celular JIMT-1 puesto que MCF7 se descartó para este estudio debido a que tenía más de 10 valores faltantes, criterio de exclusión que se utilizó para descartar variables. Se estimó que la actividad antiproliferativa en JIMT-1 es debida al acetoxipinorresinol y el ácido ursólico con una significancia de  $p < 0,001$  en ambos casos (**Tabla 8**).

Residual de la desviación					
Min	1Q	Median	3Q	Max	
-4,407	-2,439	-0,835	1,476	10,217	
Coeficientes					
	Estimado	SEM	Tvalue	Pr(> t )	Significancia
(Intercept)	4,52269	0,65513	6,904	1,67e-07	$p < 0,001$
Oleuropeína isómero 1	0,13492	0,01532	8,805	1,48e-09	$p < 0,001$

**Tabla 6.** Resumen del modelo MLG para la actividad antioxidante TEAC

Residual de la desviación					
Min	1Q	Median	3Q	Max	
-66,299	-12,195	-5,510	9,605	83,146	
Coeficientes					
	Estimado	SEM	Tvalue	Pr(> t )	Significancia
(Intercept)	125,44683	6,15193	20,391	< 2e-16	$p < 0,001$
Vainillina	-0,85119	0,14673	-5,801	3,58e-06	$p < 0,001$

**Tabla 7.** Resumen del modelo MLG para la actividad antioxidante FRAP

Residual de la desviación					
Min	1Q	Median	3Q	Max	
-164,10	-88,79	-20,14	27,46	348,75	
Coeficientes					
	Estimado	SEM	Tvalue	Pr(> t )	Significancia
(Intercept)	214,510	31,375	6,837	2,41e-07	$p < 0,001$
Ac-Pinorresinol	-35,780	6,890	-5,193	1,81e-05	$p < 0,001$
Ácido ursólico	26,582	5,148	5,164	1,96e-05	$p < 0,001$

**Tabla 8.** Resumen del modelo MLG para la actividad antiproliferativa en JIMT-1

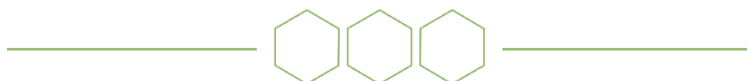
Extracto	A1A	A2A	A3A	A4A	A5A	A6A	A7A	B1A	B2A	B3A	B4A	B5A	B6A	B7A
Secologanosido isomero 1		0,08±0,01		0,02±0,001	0,01±0,001	0,18±0,02								
Hidroxitirosol		10,5±0,15			0,77±0,11		0,97±0,06		10,61±0,78				0,53±0,07	0,99±0,12
Secologanosido isomero 2														
Bencil pentosa hexosa		0,05±0,01			0,01	0,13±0,02								
EA G isomero 1		0,01±0,001		1,98±0,08	0,25±0,011				0,04±0,002			0,07±0,01		
EA G isomero 2		0,37±0,05			0,16±0,01		0,47±0,04		0,23±0,04			0,02±0,01		
Vanillina	0,99±0,02	7,26±0,35	5,23±0,4	61,73±5,17	129,17±7,9	0,61±0,12	1,7±0,45	0,2±0,1	9,52±1,03	1,77±0,05	24,23±1,51	25,38±0,90	25,33±1,39	7,37±1,08
Ácido ferúlico		0,2±0,04							1,56±0,2					1,79±0,3
Oleuropeina isomero 1		22,57±1,89	0,55±0,17	1,57±0,08	2,19±0,21	1,22±0,13	13,85±1,04		6,89±0,83	0,19±0,02	0,14±0,3	0,23±0,05	0,8±0,1	3,41±0,71
Oleuropeina isomero 2		0,61±0,07					0,41±0,10							
Siringarresinol	0,75±0,10								0,01±0,002					
Luteolina														
Ac-Pinorresinol	11,52±1,26	0,54±0,10	0,04±0,001	0,16±0,05					0,87±0,12	0,01±0,007	0,7±0,09	0,03±0,01	0,28±0,03	0,2±0,03
Diosmetina	0,62±0,05	0,03±0,01		0,08±0,01	0,01±0,002			0,26±0,07	0,11±0,02					
Pinorresinol	0,33±0,02	0,42±0,15		0,11±0,03	0,05±0,01			0,8±0,06	1,14±0,1					0,27±0,02
Ligstrosido														
Quercetina														
Ácido maslínico	0,36±0,14		0,01±0,05	0,52±0,07		0,58±0,05	0,2±0,01	0,52±0,07					0,67±0,01	
Ácido oleandólico	5,24±1,65	0,48±0,1	0,17±0,05	0,43±0,061	3,19±0,24	0,11±0,02	0,92±0,12	0,79±0,04		0,13±0,04			0,66±0,11	
Ácido ursólico	6,38±1,02	0,82±0,17	0,34±0,03	0,66±0,05	4,67±0,18	0,9±0,01	0,28±0,10	0,13±0,03		0,28±0,03			0,15±0,02	

Tabla 9. Composición de los extractos de hoja de olivo según la estación de recogida y la temperatura de secado ( $\mu\text{g/g}$ ) – Fuente: Amani Taamalli *et al.* (2019)

Extracto	C1A	C2A	C3A	C4A	C5A	C6A	C7A	D1A	D2A	D3A	D4A	D5A	D6A	D7A
Secologanosido isomero 1											0,26±	1,45±	0,63±	50,66±
Hidroxitirosol		1,05±0,02		0,23±0,01	0,22±0,03	3,34±0,48	2,33±0,17		1,67±0,21	0,13±0,02	0,29±0,09	1,42±0,14	0,56±0,05	8,7±0,74
Secologanosido isomero 2														26,72±2,13
Bencil pentosa hexosa											0,96±0,1	1,87±0,21	0,82±0,10	25,72±1,47
EA G isomero 1				1,72±0,11		0,15±0,02	0,25±0,02				1,54±0,01	0,38±0,11	0,14±0,02	3,24±0,14
EA G isomero 2				0,89±0,036		0,12±0,02	0,26±0,1				1,12±0,28	1,12±0,05	0,51±0,12	9,59±0,75
Vanillina	3,68±0,74	6,24±0,45	4,84±0,31	90,77±4,12	26,25±2,04	87,69±3,51	24,98±1,62		1,82±0,90	1,75±0,69	74,52±2,48	6,87±1,06	3,09±0,91	1,05±0,15
Ácido ferúlico	0,14±0,03						0,7±0,11					0,35±0,02	0,13±0,01	11,14±0,03
Oleuropeina isomero 1	0,1±0,01	0,6±0,03		1,06±0,12	1,04±0,05	10±0,98	10,69±1,32		6,52±1,06	4,16±1,1	15,2±2,03	47,76±3,16	20,28±2,9	206,97±7,45
Oleuropeina isomero 2							0,39±0,09							83,23±4,18
Siringarresinol	1,43±0,10							0,32±0,12		0,03±0,01				
Luteolina											0,11±0,04			1,1±0,26
Ac-Pinorresinol	6,39±1,02	0,11±0,02	0,04±0,01	0,37±0,13				10,74±0,0	0,02±0,0	0,21±0,0				
Diosmetina	3,12±0,28							1,13±0,24		0,81±0,19	0,16±0,10			0,2±0,1
Pinorresinol	1,27±0,91	0,1±0,01						2,13±0,84	0,03±0,01	1,08±0,03				
Ligstrosido				0,65±0,17								1,62±0,12	0,52±0,03	30,37±2,51
Quercetina														3,91±0,65
Ácido maslínico	0,74±0,15		0,94±0,21				0,47±0,13	0,25±0,02	0,22±0,01	0,59±0,18	0,6±0,03	0,66±0,10	0,28±0,01	2,24±0,31
Ácido oleandólico	11,13±0,98	0,23±0,02	0,17±0,0	6,52±0,0	0,38±0,0		4,81±0,58	4,99±0,46	0,29±0,01	0,52±0,03	9,78±0,99	7,88±1,02	0,29±0,06	
Ácido ursólico	15,52±1,12	0,3±0,015	0,19±0,02		0,39±0,01	13,46±1,53	3,6±1,04	4,92±0,72	0,45±0,08	0,87±0,03		8,85±1,89	0,33±0,01	16,54±1,63

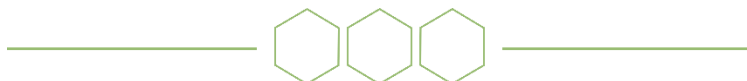
Tabla 9. Composición de los extractos de hoja de olivo según la estación de recogida y la temperatura de secado ( $\mu\text{g/g}$ ) – Fuente: Amani Taamalli *et al.* (2019)





## **Capítulo II:**

**Estudio del mecanismo de  
acción de la mezcla de flavonas  
DAL511 en los diferentes  
subtipos moleculares de cáncer  
de mama**





En este capítulo se llevó a cabo un estudio del efecto de la mezcla DAL511, mezcla de diosmetina, apigenina y luteolina a la proporción presente en el extracto de origen 5:1:1 (mg/g de extracto seco) sobre la viabilidad, supervivencia, migración e invasión en células tumorales de cáncer de mama, así como la determinación de los principales mecanismo de muerte celular que desencadena en dichas células.

Para ello se utilizaron cuatro modelos celulares, cada uno representativo de los tres principales subtipos moleculares, y clínicos, de cáncer de mama así como un modelo de tumor secundario o metastásico en cerebro derivado de TNBC, MCF7 para el luminal, JIMT-1 para el HER2+, MDA-MB-231 para el TNBC y MDA-MB-231-BR para el tumor secundario en cerebro de TNBC.

## 4.5. Mecanismo de acción de la mezcla DAL511 en un modelo de cáncer de mama de subtipo luminal

### 4.5.1. Determinación del efecto antiproliferativo

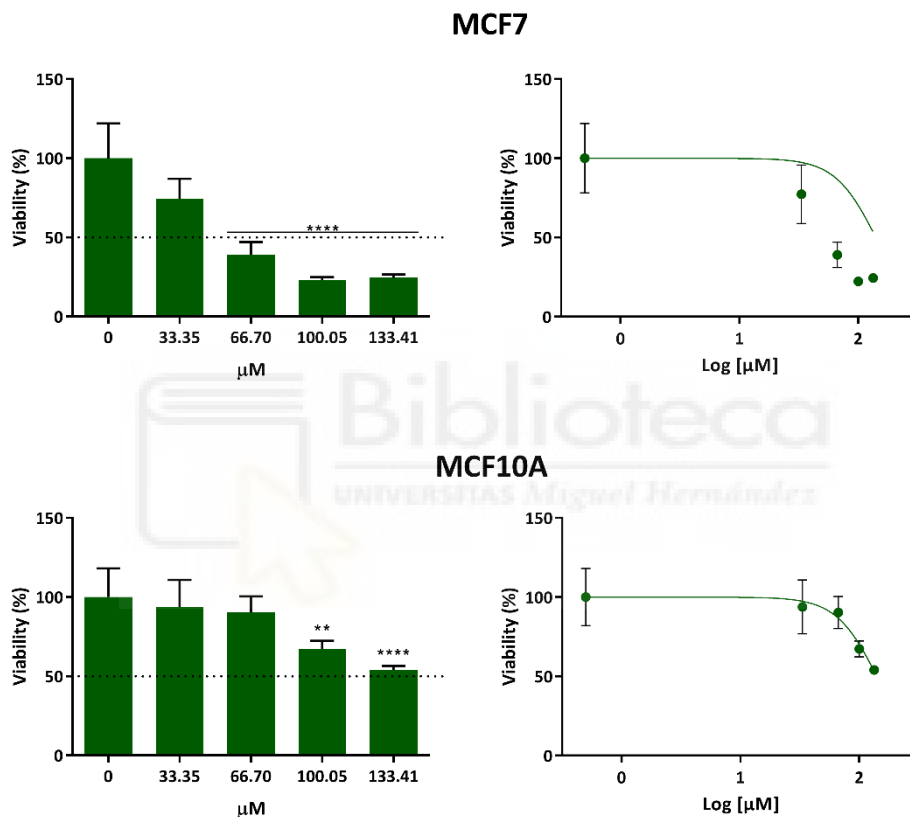
Se analizó la actividad antiproliferativa de la mezcla DAL511 en la línea celular MCF7 tras 24 horas de tratamiento y en paralelo se estudió también en la línea celular MCF10A para comparar el efecto entre células tumorales y no tumorales.

Los resultados muestran un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de la línea MCF7 cuando son tratadas con DAL511 y dicho efecto, aunque se puede apreciar también en la línea control MCF10A, es más acusado en la línea tumoral (**Figura 52**).

La mezcla DAL511 presentó una  $IC_{50}$  de  $57,22 \pm 10,89 \mu M$  en la línea celular MCF7 frente a la  $IC_{50}$  de  $140,9 \pm 13,3 \mu M$  en MCF10A por lo que su IT fue de 2,46, considerándose por tanto de índice terapéutico estrecho (**Tabla 10**).

	IC <sub>50</sub> (μM)	IT
MCF7	57,22 ± 10,89	2,46
MCF10A	140,9 ± 13,3	

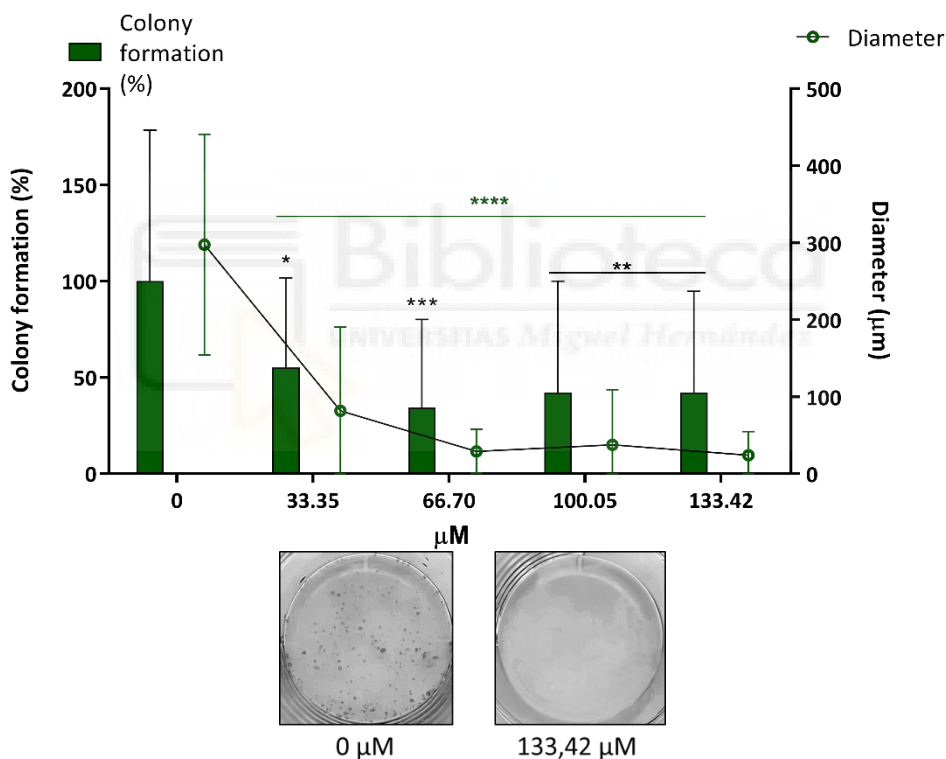
**Tabla 10.** Valores de IC<sub>50</sub> ±SD (n=6) tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en MCF7



**Figura 52.** Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama luminal MCF7 y la línea control no tumoral MCF10A. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el conteo de núcleos con la sonda Hoechst 33342. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%). \*\*\*\* (p<0,0001) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 μM).

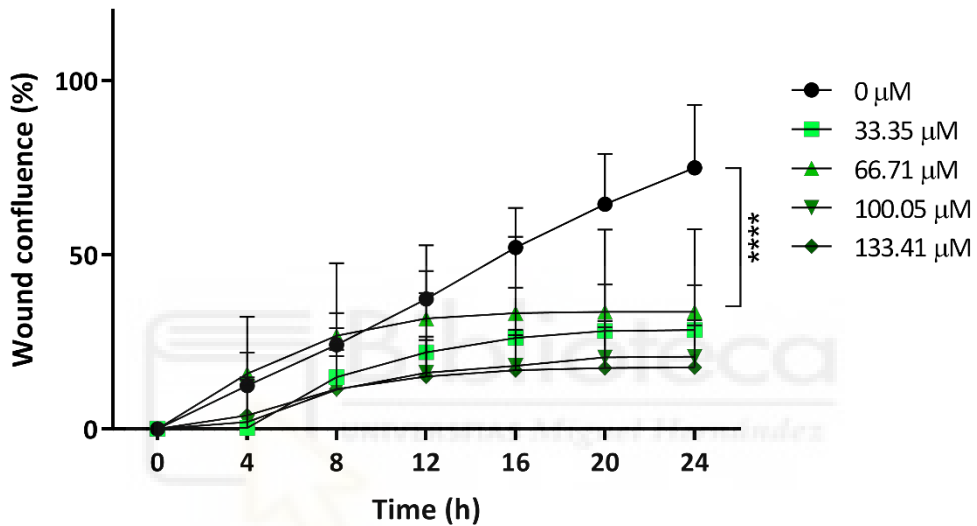
Una vez determinado el efecto antiproliferativo de la mezcla DAL511 se estudió el efecto de ésta sobre las capacidades funcionales de las células tumorales de formar colonias, migrar e invadir.

En cuanto a la capacidad clonogénica (**Figura 53**) se determinó mediante un ensayo de formación de colonias para determinar la supervivencia post-tratamiento. Se observó una disminución de casi el 50% en el número de colonias y de más del 70 % en su tamaño a la concentración del DAL511 más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y llegando a reducir más de un 90% el diámetro a 133,42  $\mu\text{M}$ .



**Figura 53.** Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica en la línea de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células se incubaron con medio de cultivo completo durante 7 días y se determinó la capacidad de formación de colonias mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de formación de colonias (%) y como el diámetro medio de las colonias ( $\mu\text{m}$ ). \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ) (Verde-Diámetro, Negro-%Formación de colonias).

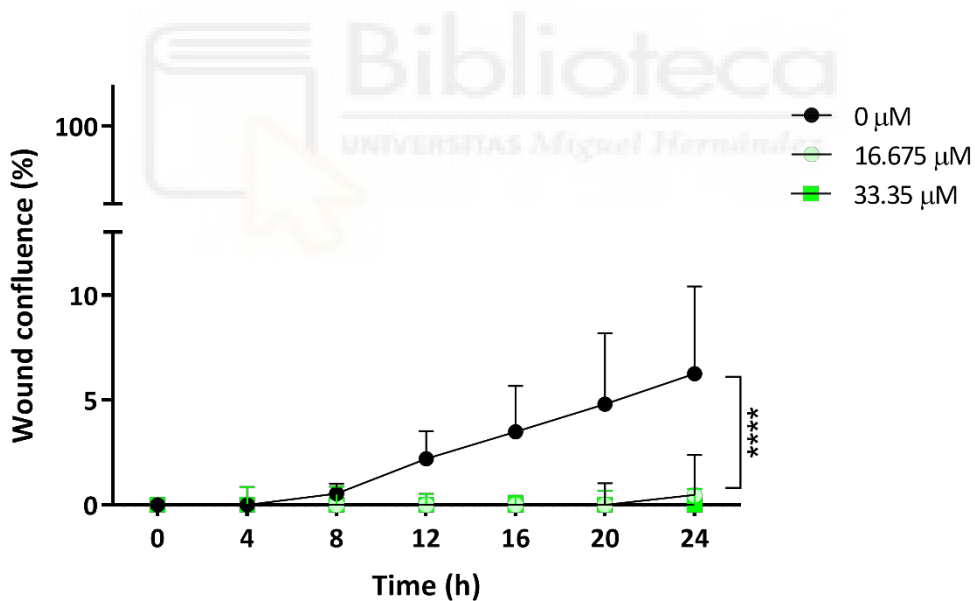
La capacidad migratoria (**Figura 54**) se determinó mediante el ensayo de wound healing o cierre de herida que consiste en realizar un herida en una monocapa celular y observar la migración celular en presencia del tratamiento durante 24 horas. Se observó una reducción de casi el 50% a la concentración más baja ensayada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y en más del 60% a la concentración más alta, 133,42  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 54.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing en la línea de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

En cuanto a la invasión (**Figura 55**) se determinó mediante el ensayo de wound healing o cierre de herida en presencia de matrigel, que consiste en realizar un herida en una monocapa celular sembrada sobre pocillos pretratados con matrigel y observar la migración celular en presencia del tratamiento disuelto en matrigel durante 24 horas. Se observó un efecto más pronunciado, y se analizaron solo las concentraciones 16,675  $\mu\text{M}$  y 33,35  $\mu\text{M}$  ya que concentraciones superiores provocaban el retraimiento del borde de la herida impidiendo su análisis.

La línea celular MCF7 no tiene elevadas capacidades invasivas, llegando el control sin tratamiento a invadir en torno al 6% de la herida sin embargo el tratamiento a la concentración más baja ensayada, 16,675  $\mu\text{M}$ , llegó a inhibir prácticamente por completo la invasión del matrigel.

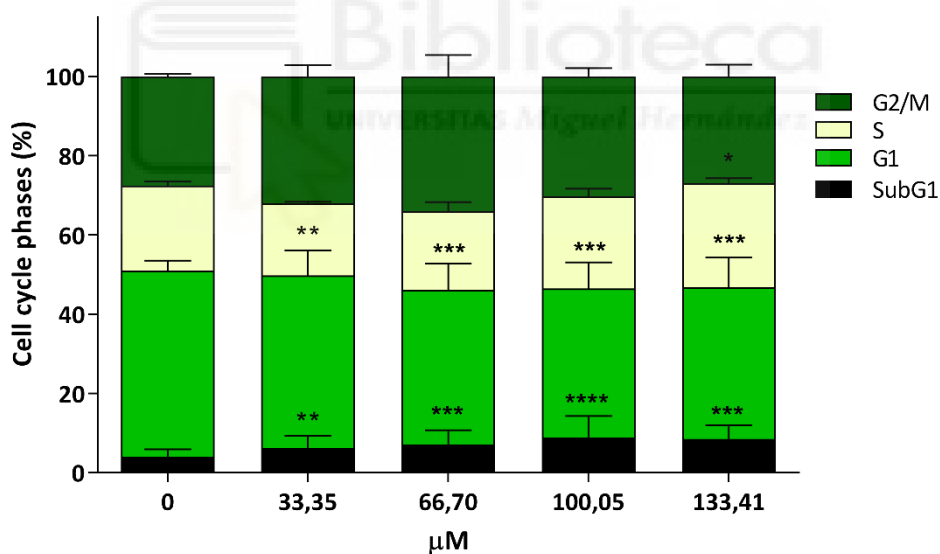


**Figura 55.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel en la línea de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (16,675-33,35  $\mu\text{M}$ ) disueltas en matrigel durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%).\*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.5.2. Determinación del mecanismo de muerte celular

Una vez conocidos los efectos antiproliferativos y sobre la capacidad de formación de colonias, de migración e invasión de la mezcla DAL511 en la línea celular MCF7 se procedió a caracterizar dicho efecto antiproliferativo estudiando su mecanismo de muerte.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del ciclo celular en células tratadas con la mezcla DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24h. Como se observa en la **Figura 56** se produjo un leve bloqueo del ciclo celular en la fase S con un aumento significativo del 6% de la fase S y una disminución significativa del 6% en



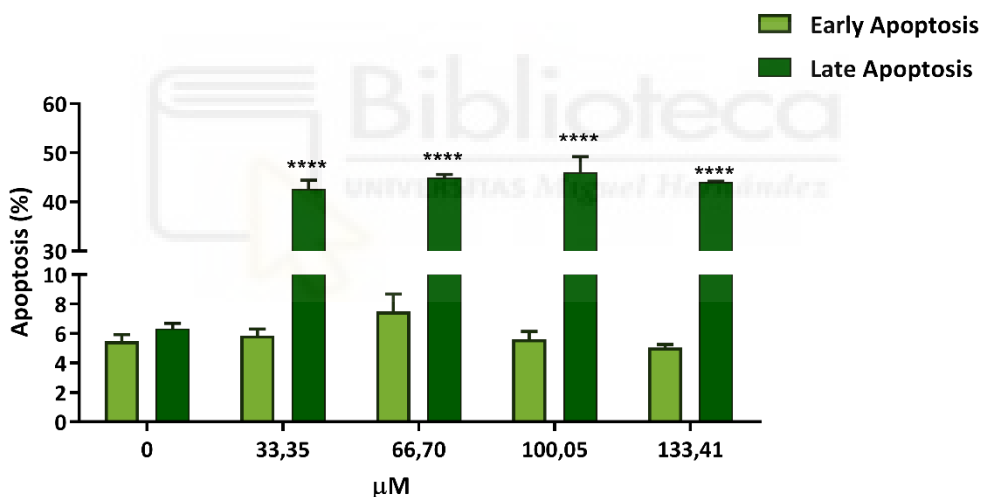
**Figura 56.** Efecto de la mezcla DAL511 en el ciclo celular en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de las fases del ciclo celular (%). \* ( $p < 0,1$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ), y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).



la fase G1 a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ . Además, se observó un aumento significativo de la fase subG1 llegando hasta un 8,5%.

Estos resultados hacen pensar que existe un efecto citotóxico que podría deberse a apoptosis, por ello el siguiente paso fue detectar la apoptosis mediante marcaje con Anexina-V. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. El porcentaje de apoptosis se cuantificó tanto a nivel basal como tras la adición de los tratamientos.

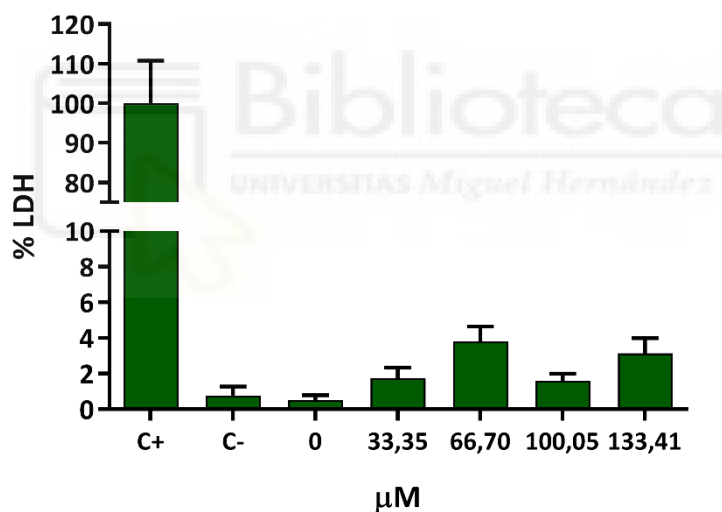
Como se puede observar en la **Figura 57** se produjo un incremento significativo de la apoptosis tardía de casi el 40% con la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , mientras que no se apreciaron variaciones en la apoptosis temprana.



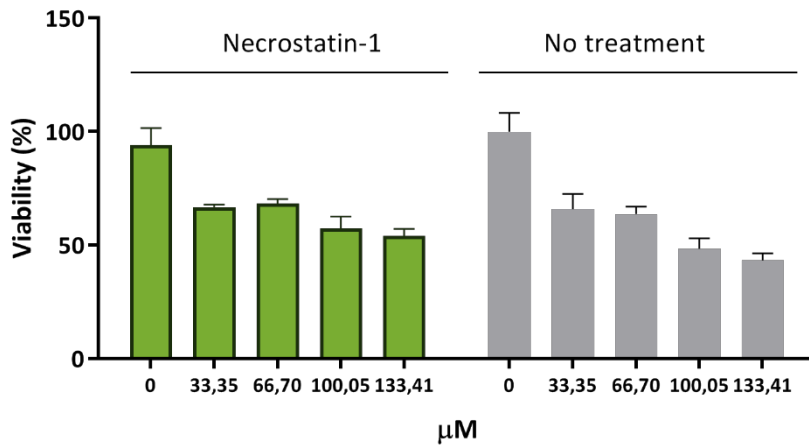
**Figura 57.** Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de apoptosis temprana y tardía (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Debido a que tras 24 horas de tratamiento solo se observaban variaciones en la apoptosis tardía y estos resultados son compatibles no solo con apoptosis, sino también con otros tipos de muerte celular, de manera complementaria se determinó la integridad de la membrana citoplasmática mediante la cuantificación de LDH liberada (**Figura 58**), así como la determinación de necroptosis (**Figura 59**) y autofagia (**Figura 60**) utilizando sus inhibidores correspondientes, necrostatina-1 y cloroquina, respectivamente.

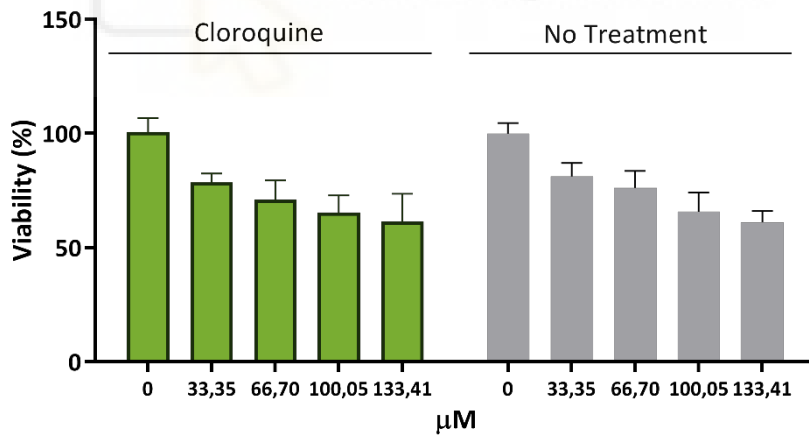
No se observaron diferencias significativas en ninguno de los tres tipos de ensayos realizados por lo que se descartó que la citotoxicidad observada se debiera a necrosis, necroptosis o autofagia.



**Figura 58.** Efecto sobre la liberación de la LDH de la mezcla DAL511 en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células necróticas se determinó mediante el kit de citotoxicidad LDH. Los valores se presentan como porcentaje de citotoxicidad (%).



**Figura 59.** Efecto de la mezcla DAL511 en la viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 en presencia del inhibidor de la necroptosis necrostatina-1. Las células se pretrataron con necrostatina-1 durante 2 horas y se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%).



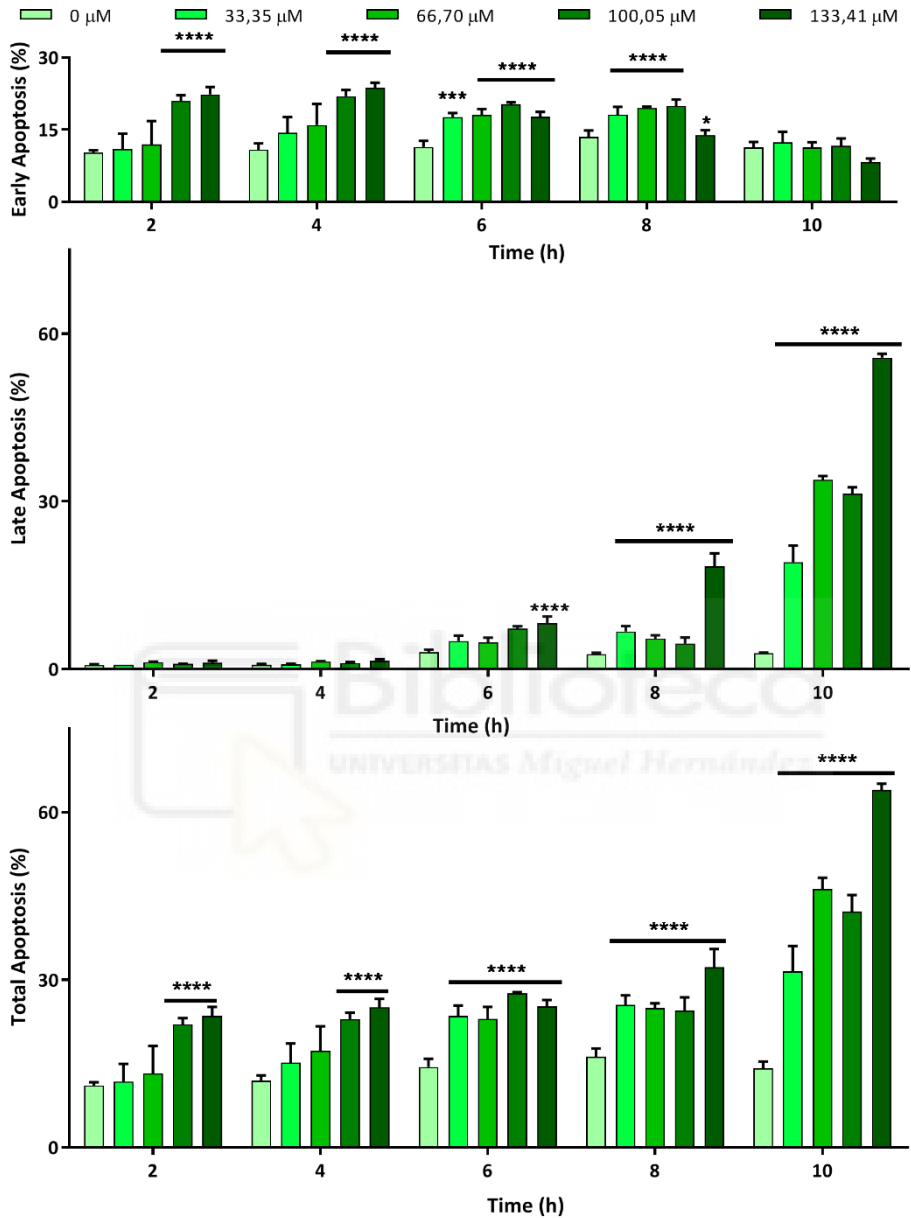
**Figura 60.** Efecto de la mezcla DAL511 en la viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 en presencia del inhibidor de la autofagia cloroquina. Las células se pretrataron con cloroquina durante 2 horas y se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%).

Una vez descartadas otros posibles tipos de muerte celular se repitió la determinación de la apoptosis mediante marcaje con Anexina-V pero realizando un curso temporal de 10 h para observar si ésta aparecía a tiempos más cortos.

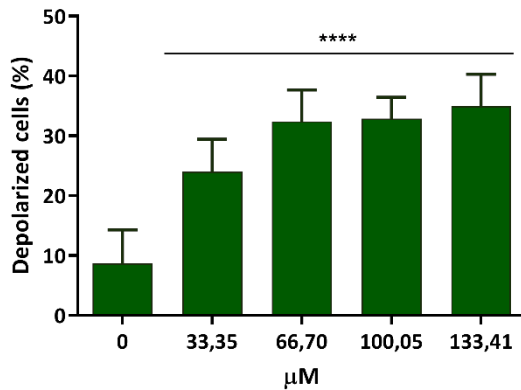
Como se observa en la **Figura 61** el incremento significativo en la apoptosis temprana comenzó a las 2 h de tratamiento para las concentraciones más altas, 100,05  $\mu\text{M}$  y 133,41  $\mu\text{M}$ , y dejó de observarse en torno a las 8-10 h de tratamiento, cuando comenzó a apreciarse un incremento significativo en la apoptosis tardía. Es decir, la citotoxicidad se debe a un efecto apoptótico que comienza al poco tiempo del inicio del tratamiento y por ello no se observó en los ensayos a 24 horas (**Figura 57**).

Una vez determinado que el efecto citotóxico se debe a una muerte por apoptosis se procedió a determinar el potencial de membrana mitocondrial ya que la mitocondria puede verse involucrada en los procesos apoptóticos. Para ello se determinó el PMM por dos métodos diferentes, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

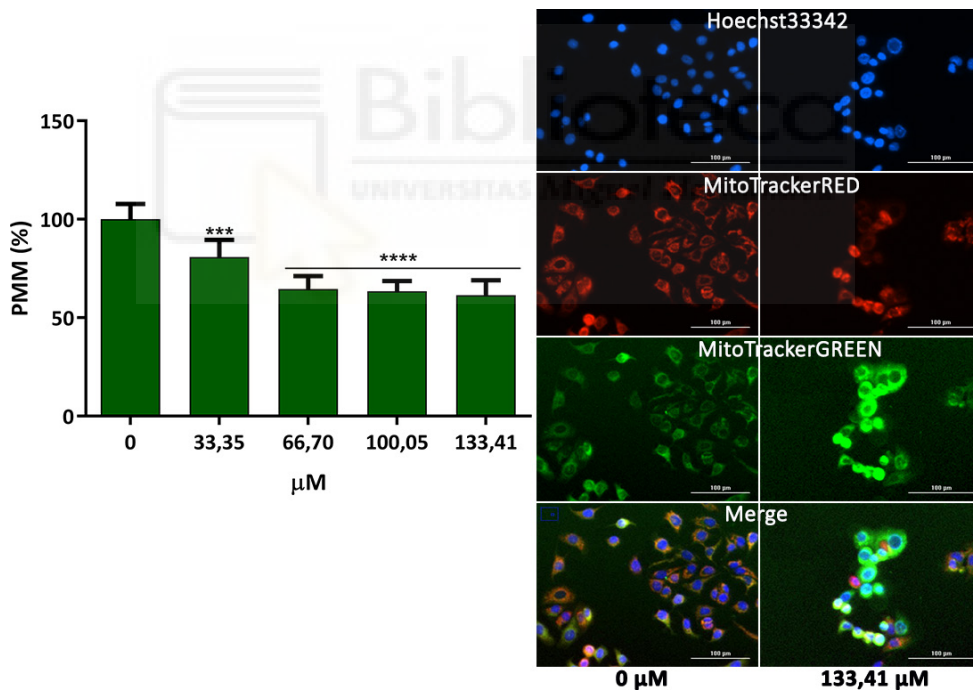
Como se observa en la **Figura 62** el tratamiento con DAL511 produjo un incremento en la población de células despolarizadas de casi el 20% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y llegando cerca del 40% a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$  según la citometría de flujo. Según la microscopía de fluorescencia (**Figura 63**) se produjo un descenso del PMM de casi el 20% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y casi del 40% para la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ , de manera que ambas medidas coinciden.



**Figura 61.** Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 2-10 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de apoptosis temprana, tardía y total (%). \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 μM).



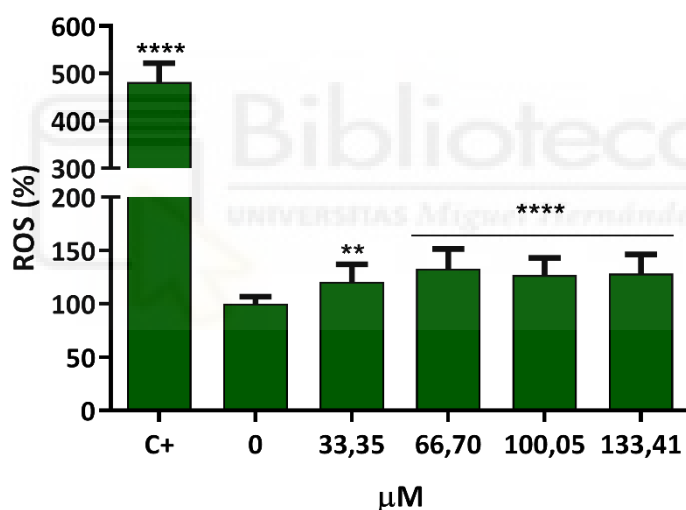
**Figura 62.** Efecto de la mezcla DAL511 en el PMM en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de células despolarizadas (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 μM).



**Figura 63.** Efecto de la mezcla DAL511 en el PMM en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje del potencial de membrana mitocondrial (%). \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 μM).

Por último, se determinó la capacidad de la mezcla DAL511 de aumentar la producción de ROS puesto que este hecho podría tener relación con el daño mitocondrial. Por una parte, el carácter prooxidante que pueden presentar en ocasiones los polifenoles podría inducir un aumento de ROS que provoque daño mitocondrial, y por otra parte, si se produce apoptosis por la vía mitocondrial el aumento de ROS sería una consecuencia del propio daño mitocondrial.

Como se observa en la **Figura 64** se produjo un incremento de cerca del 20% en la producción de ROS con la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$  llegando hasta el 30% con la concentración más alta, 133,41  $\mu\text{M}$ .



**Figura 64.** Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama luminal MCF7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la generación de ROS intracelular mediante la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  y el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de ROS (%).\*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

## 4.6.Mecanismo de acción de la mezcla DAL511 en un modelo de cáncer de mama de subtipo HER2+

### 4.6.1.Determinación del efecto antiproliferativo

Se analizó la actividad antiproliferativa de la mezcla DAL511 en la línea celular JIMT-1 y la línea celular MCF10A, tras 24 horas de tratamiento, con el objetivo comparar el efecto entre células tumorales y sanas.

Los resultados muestran un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de la línea JIMT-1 cuando son tratadas con DAL511 y dicho efecto, aunque se puede apreciar también en la línea control MCF10A, es más acusado en la línea tumoral (**Figura 65**).

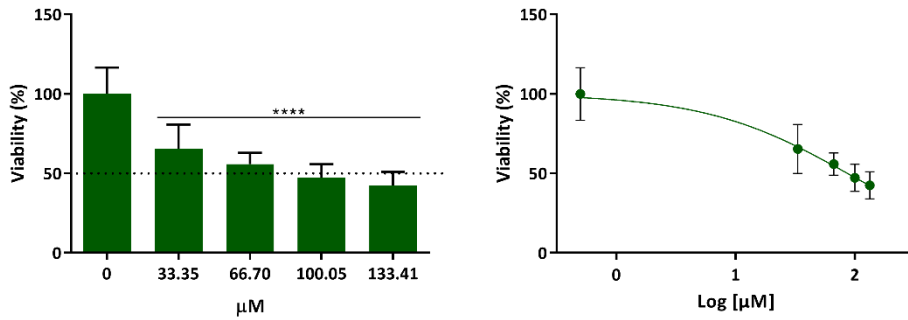
La mezcla DAL511 presentó una  $IC_{50}$  de  $86,69 \pm 16,38 \mu M$  en la línea celular JIMT-1 frente a la  $IC_{50}$  de  $140,9 \pm 13,3 \mu M$  en MCF10A por lo que su IT fue de 1,63, considerándose, por tanto, de índice terapéutico no seguro (**Tabla 11**).

	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	IT
JIMT-1	$86,69 \pm 16,38$	1,63
MCF10A	$140,9 \pm 13,3$	

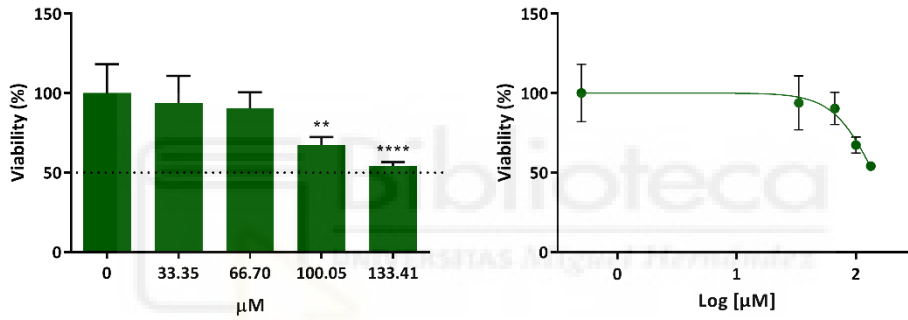
**Tabla 11.** Valores de  $IC_{50} \pm SD$  (n=6) tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en JIMT-1



### JIMT-1



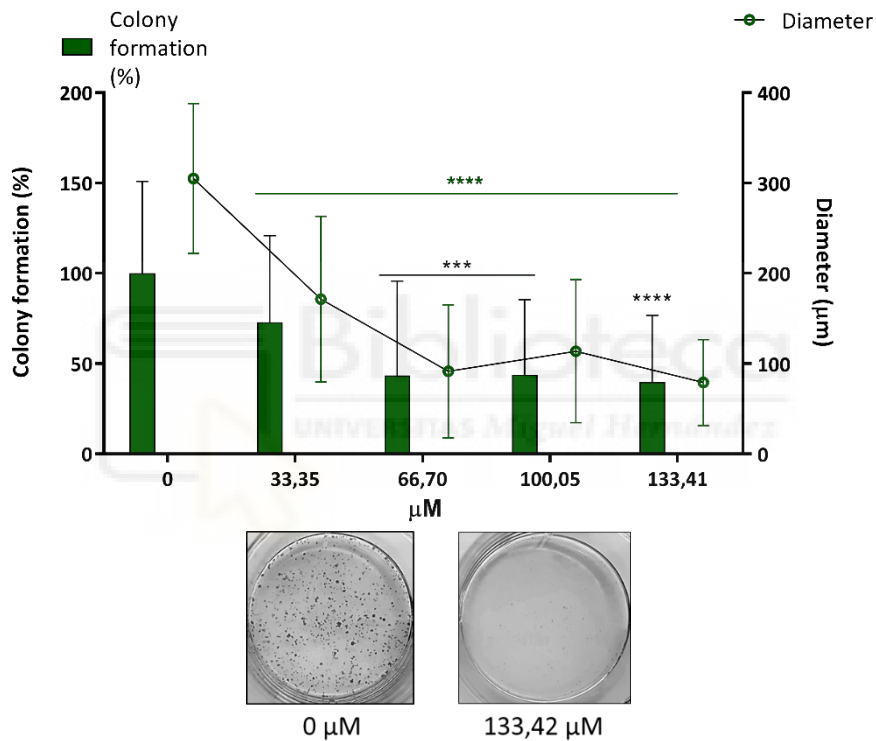
### MCF10A



**Figura 65.** Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 y la línea control no tumoral MCF10A. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el conteo de núcleos con la sonda Hoechst 33342. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 μM).

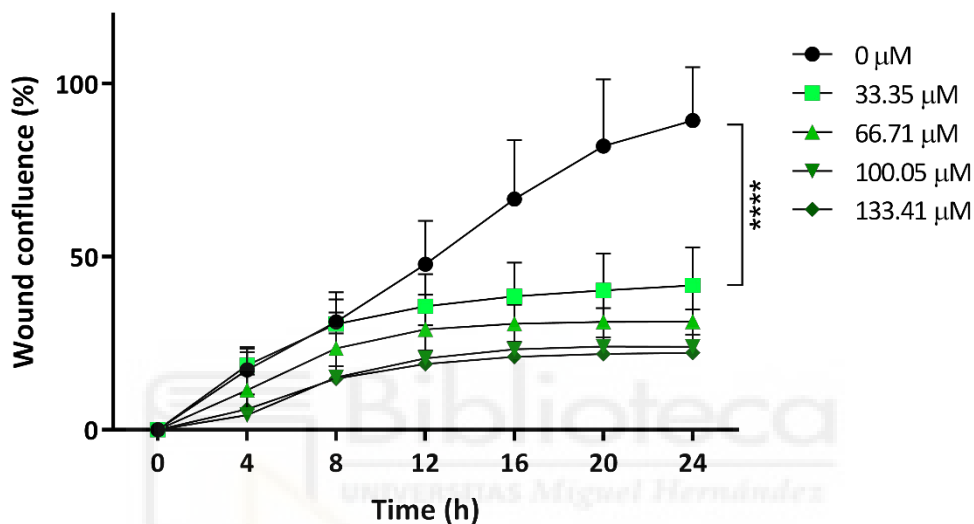
Tras determinar el efecto antiproliferativo de la mezcla DAL511 se pasó a estudiar la capacidad de formación de colonias, de migración y de invasión, todas capacidades funcionales de las células tumorales.

En cuanto a la capacidad clonogénica (**Figura 66**), determinada mediante el ensayo de colonias explicado con anterioridad basado en la supervivencia celular post-tratamiento, se observó una disminución de casi el 30% en el número de colonias y de casi del 40% en su tamaño a la concentración del DAL511 más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y llegando a reducir más de un 70% el diámetro y de un 60% el número de colonias a 133,42  $\mu\text{M}$ .



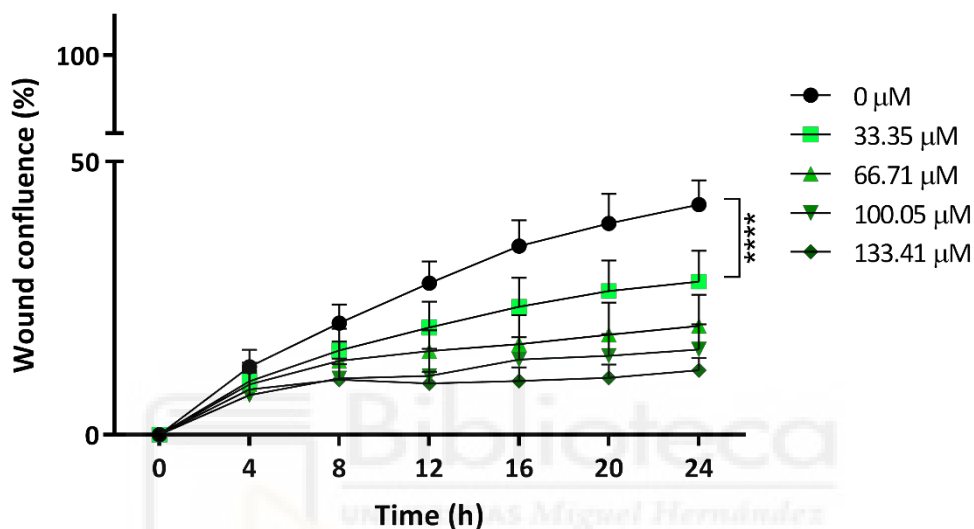
**Figura 66.** Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica de la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células se incubaron con medio de cultivo completo durante 7 días y se determinó la capacidad de formación de colonias mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de formación de colonias (%) y como el diámetro medio de las colonias ( $\mu\text{m}$ ). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ) (Verde-Diámetro, Negro-%Formación de colonias).

La capacidad migratoria (**Figura 67**), determinada mediante el ensayo wound healing o de cierre de herida, se vio reducida en más un 50% a la concentración más baja ensayada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y en más del 80% a la concentración más alta, 133,42  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 67.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%).\*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

En cuanto a la invasión (**Figura 68**), determinada también con el ensayo de wound healing pero en presencia de matrigel recreando la matriz extracelular, se observó una disminución de en torno al 15% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , llegando hasta más del 30% a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ .

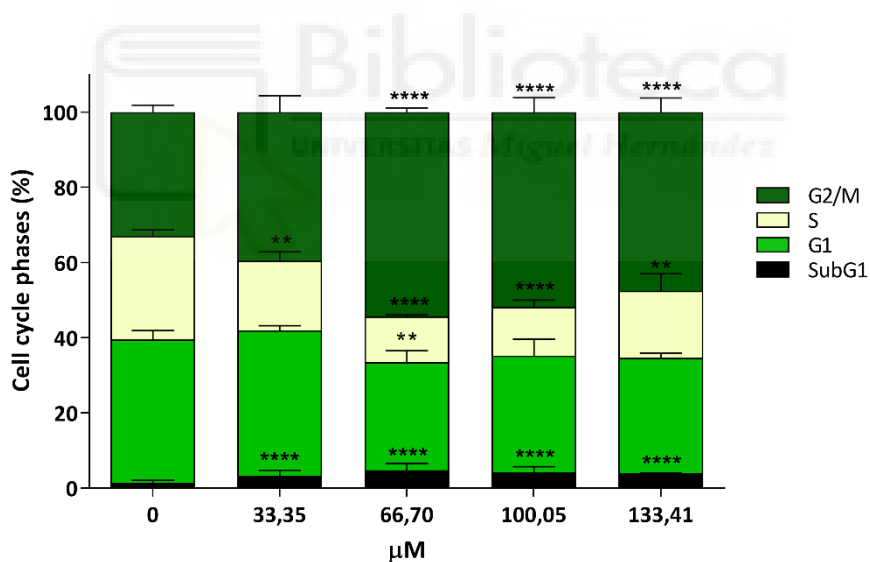


**Figura 68.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) disueltas en matrigel durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%).\*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.6.2. Determinación del mecanismo de muerte celular

Una vez observados los efectos antiproliferativos y de inhibición de la capacidad de formación de colonias, de migración e invasión de la mezcla DAL511 en la línea celular JIMT-1 se procedió a caracterizar dicho efecto antiproliferativo estudiando su mecanismo de muerte.

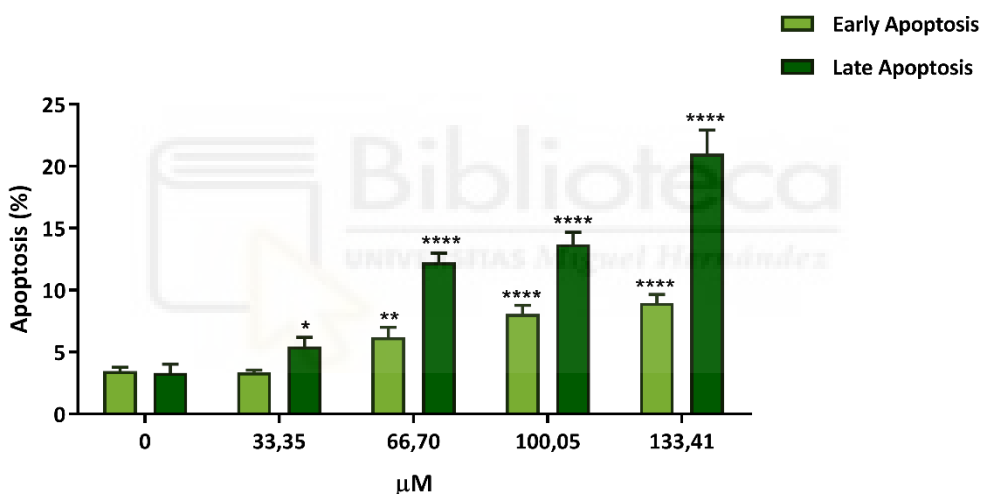
En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del ciclo celular en células tratadas con la mezcla DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24h. Como se observa en la **Figura 69** se produce un bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M con un aumento significativo del 15% de la fase G2/M y una disminución significativa del 10% de las fases G1 y S a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ . Además, se observa un aumento significativo de la fase subG1 llegando hasta un 4%.



**Figura 69.** Efecto de la mezcla DAL511 en el ciclo celular de la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de las fases del ciclo celular (%). \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Estos resultados hacen pensar que existe un efecto citostático y un leve efecto citotóxico que podría deberse a apoptosis, por ello el siguiente paso fue detectar la apoptosis mediante marcaje con Anexina-V. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. El porcentaje de apoptosis se cuantificó tanto a nivel basal como tras la adición de los tratamientos.

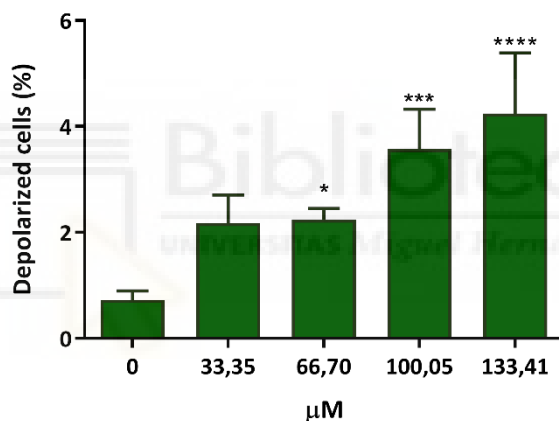
Como se puede observar en la **Figura 70** se produce un efecto dosis-dependiente (mayor que el observado en las células MCF7) con un incremento significativo de la apoptosis tardía de casi el 20% y del 5% en la apoptosis temprana con la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ .



**Figura 70.** Determinación de apoptosis mediante Anexina-V la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de apoptosis temprana y tardía (%). \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

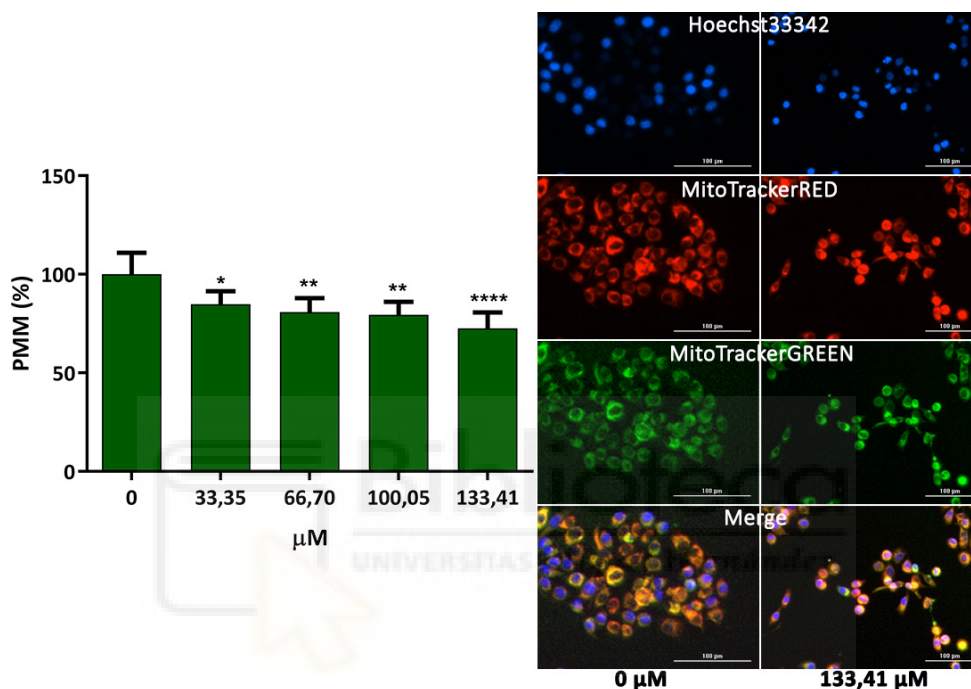
Una vez determinado que el efecto citotóxico se debe a una muerte por apoptosis se procedió a determinar el potencial de membrana mitocondrial ya que la mitocondria puede verse involucrada en los procesos apoptóticos además de influir en el bloqueo del ciclo celular. Para ello, al igual que en el anterior modelo, se determinó el PMM por dos métodos diferentes, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Como se observa en la **Figura 71** el tratamiento con DAL511 produjo un incremento de casi el 20% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y llegando cerca del 40% a la concentración más alta ensayada, 133,41  $\mu\text{M}$  según la citometría de flujo.



**Figura 71.** Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de células despolarizadas (%). \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Según la microscopía de fluorescencia (**Figura 72**) se produjo un descenso del PMM de casi el 20% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y casi del 40% para la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ , de manera que ambas medidas coinciden.

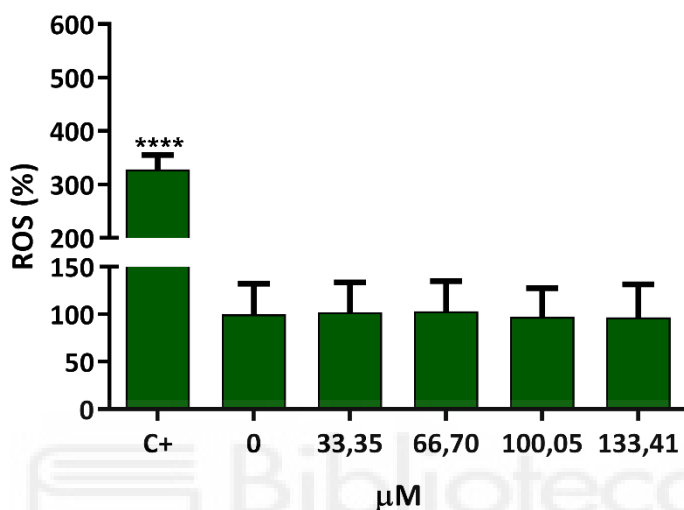


**Figura 72.** Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje del potencial de membrana mitocondrial (%). \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Por último, se determinó la capacidad de la mezcla DAL511 de aumentar la producción de ROS puesto que podría estar tener relación con el daño mitocondrial debido al carácter prooxidante que pueden presentar en ocasiones los polifenoles o que ocurra una apoptosis por vía mitocondrial.



Como se observa en la **Figura 73** no se producen variaciones significativas con el tratamiento por lo que la producción de ROS no se ve afectada por DAL511 en la línea celular JIMT-1.



**Figura 73.** Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la generación de ROS intracelular mediante la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA y el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de ROS (%).

## 4.7.Mecanismo de acción de la mezcla DAL en un modelo de cáncer de mama de subtipo TNBC

### 4.7.1.Determinación del efecto antiproliferativo

A continuación se analizó la actividad antiproliferativa de la mezcla DAL511 en la línea celular triple negativa MDA-MB-231 tras 24 horas de tratamiento y, además, como en anteriores líneas celulares, se determinó el efecto antiproliferativo en la línea celular MCF10A para realizar una comparación entre células tumorales y sanas.

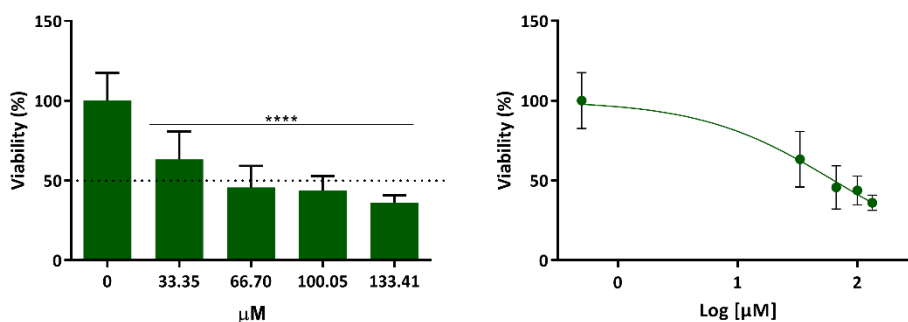
Los resultados muestran un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de la línea MDA-MB-231 cuando son tratadas con DAL511 y dicho efecto, aunque se puede apreciar también en la línea control MCF10A, siendo más acusado en la línea tumoral (**Figura 74**).

La mezcla DAL511 presentó una  $IC_{50}$  de  $86,69 \pm 16,38 \mu M$  en la línea celular MDA-MB-231 frente a la  $IC_{50}$  de  $140,9 \pm 13,3 \mu M$  en MCF10A por lo que su IT fue de 2,30, considerándose por tanto de índice terapéutico estrecho (**Tabla 12**).

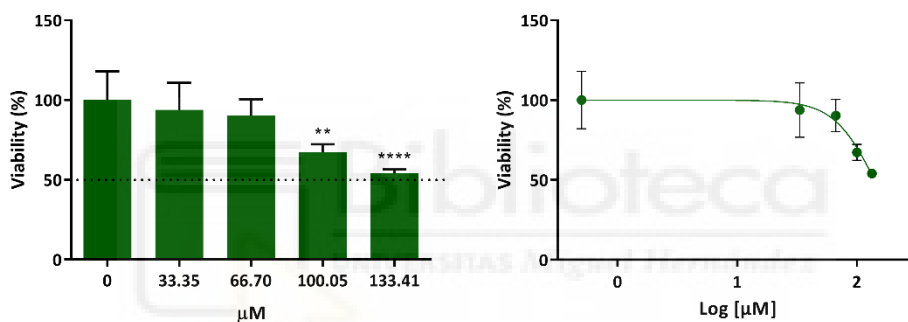
	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	IT
MDA-MB-231	$61,24 \pm 18,63$	2,30
MCF10A	$140,9 \pm 13,3$	

**Tabla 12.** Valores de  $IC_{50} \pm SD$  (n=6) tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en MDA-MB-231

### MDA-MB-231



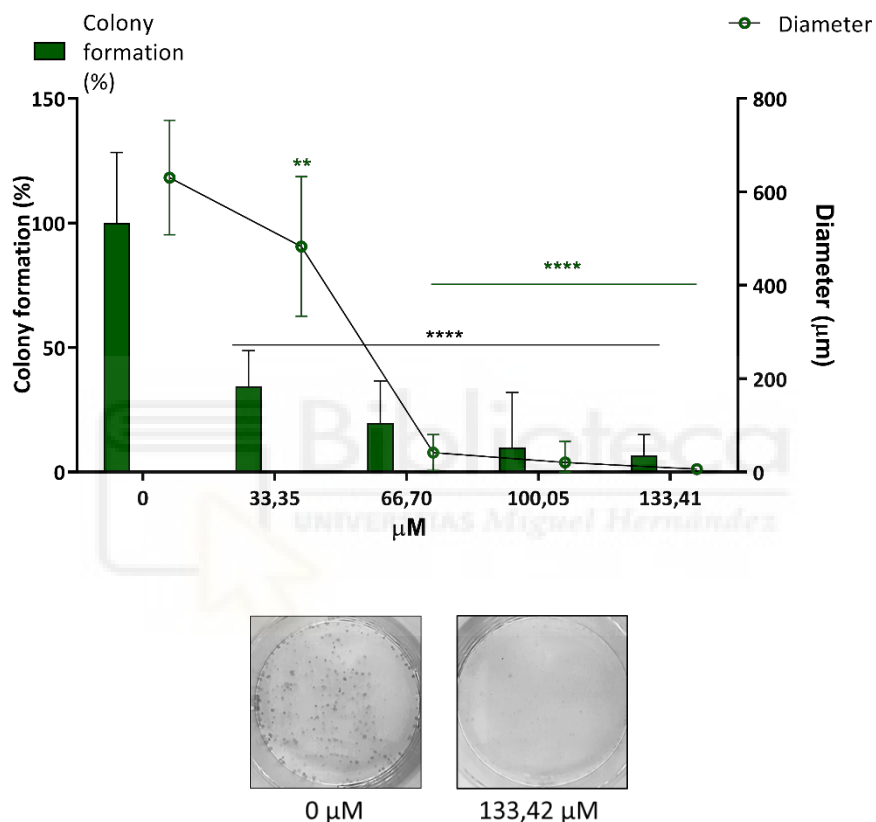
### MCF10A



**Figura 74.** Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231 y la línea control no tumoral MCF10A. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 µM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el conteo de núcleos con la sonda Hoechst 33342. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 µM).

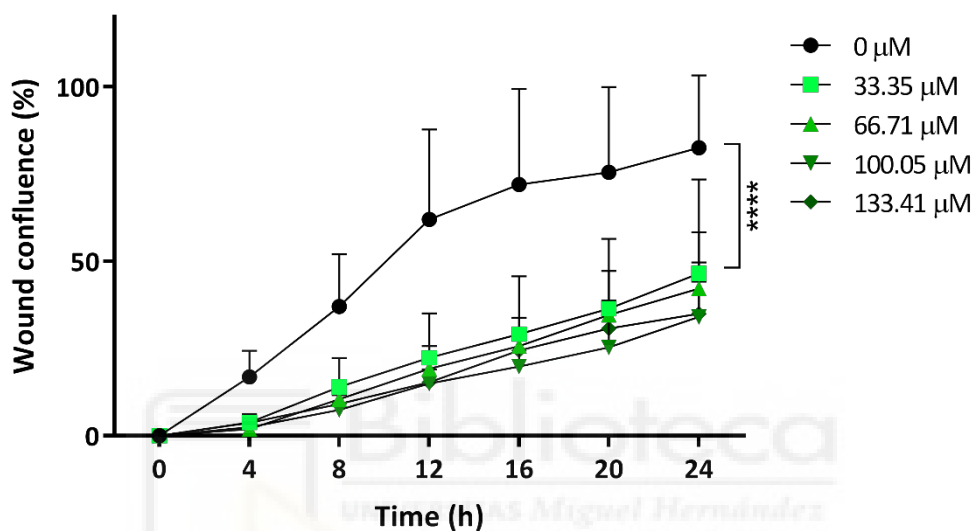
Seguidamente, tras comprobar el efecto antiproliferativo de la mezcla DAL511 se continuó con un esquema de trabajo similar al realizado con las anteriores líneas celulares, estudiando el efecto de la mezcla sobre las capacidades funcionales de las células tumorales de formar colonias, migrar e invadir.

En cuanto a la capacidad clonogénica (**Figura 75**), la cual se determinó mediante el estudio de la supervivencia post-tratamiento con el ensayo de formación de colonias, se observó una disminución de más del 80% en el número de colonias y de más del 90% en su tamaño a la concentración del DAL511 más alta probada, 133,42  $\mu\text{M}$ .



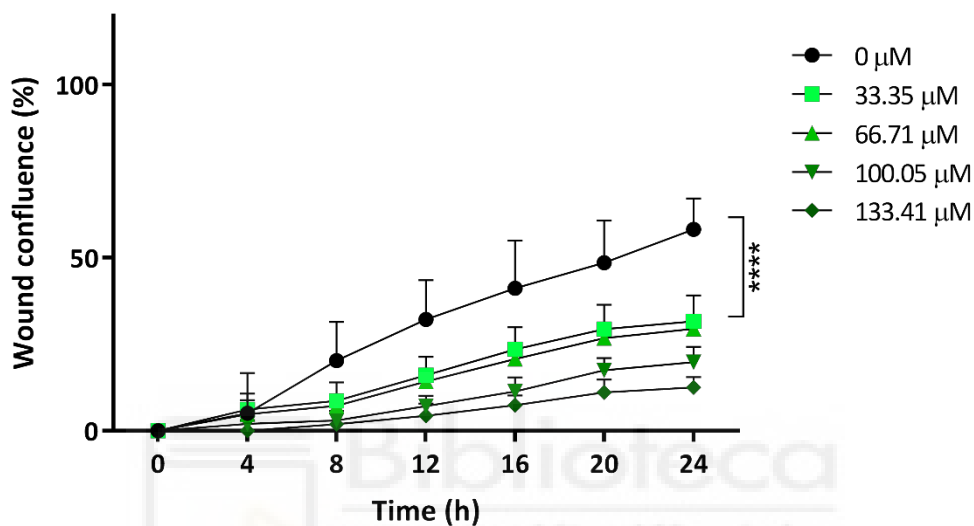
**Figura 75.** Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células se incubaron con medio de cultivo completo durante 7 días y se determinó la capacidad de formación de colonias mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de formación de colonias (%) y como el diámetro medio de las colonias ( $\mu\text{m}$ ). \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ) (Verde-Diámetro, Negro-Formación de colonias).

La capacidad migratoria (**Figura 76**), determinada mediante el ensayo de wound healing o cierre de herida, se vio reducida en más del 30% a la concentración más baja ensayada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y en casi el 50% a la concentración más alta, 133,42  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 76.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

En cuanto a la invasión (**Figura 77**), que se determinó mediante el ensayo de wound healing o cierre de herida en presencia de matrigel, se observó una disminución de entorno al 20% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , llegando hasta más del 40% a la concentración más alta testada, 133,41  $\mu\text{M}$ .

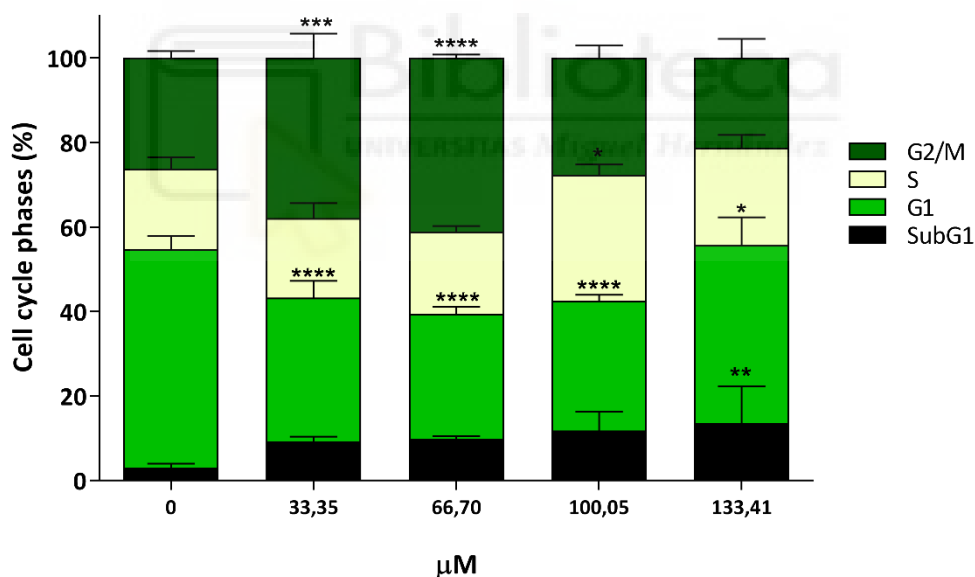


**Figura 77.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) disueltas en matrigel durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.7.2. Determinación del mecanismo de muerte celular

Comprobados los efectos antiproliferativos y de inhibición sobre la capacidad de formación de colonias, de migración e invasión de la mezcla DAL511 en la línea celular MDA-MB-231 se procedió a caracterizar dicho efecto antiproliferativo estudiando su mecanismo de acción.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del ciclo celular en células tratadas con la mezcla DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24h. Como se observa en la **Figura 78** se produjo un aumento significativo de la fase subG1 llegando hasta un 15% a la concentración más alta ensayada 133,41  $\mu\text{M}$  y siendo más alto que el observado para esta fase en las anteriores líneas celulares (MCF7 y JIMT-1).

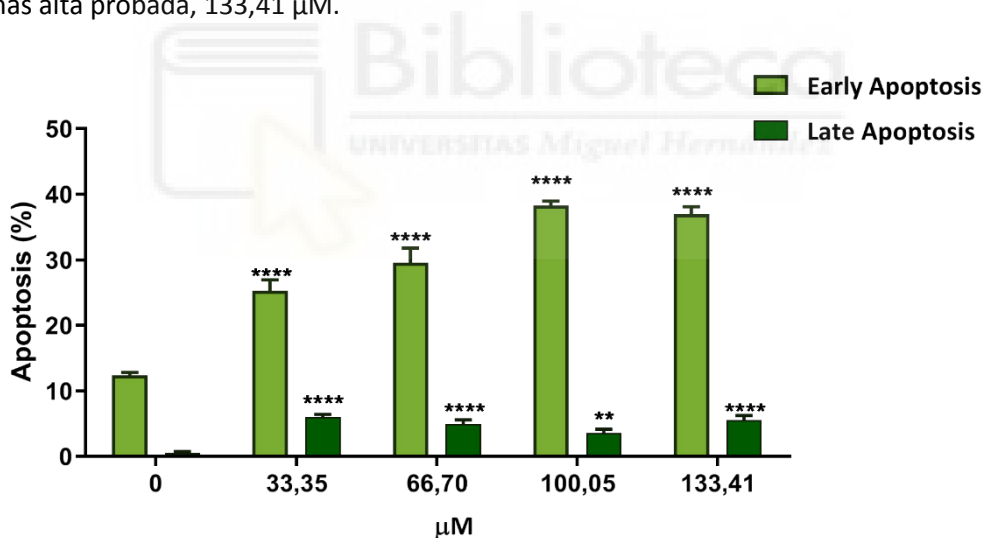


**Figura 78.** Efecto de la mezcla DAL511 en el ciclo de la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de las fases del ciclo celular (%). \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Además, se observó un aumento significativo de la fase G2/M en torno a 10-15% acompañado de un descenso de la fase G1 del 20% a las concentraciones más bajas, 33,35 y 66,70  $\mu\text{M}$ .

Estos resultados hacen pensar que existe un efecto citotóxico que podría deberse a apoptosis, por ello el siguiente paso fue detectar la apoptosis mediante marcaje con Anexina-V como se hizo en las anteriores líneas celulares (MCF7 y JIMT-1). Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. El porcentaje de apoptosis se cuantificó tanto a nivel basal como tras la adición de los tratamientos.

Como se puede observar en la **Figura 79** se produjo un incremento significativo de la apoptosis temprana de casi el 20% y del 6% en la apoptosis tardía con la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ .

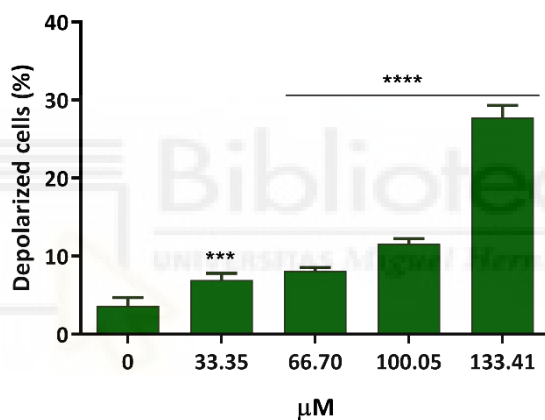


**Figura 79.** Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de apoptosis temprana y tardía (%). \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).



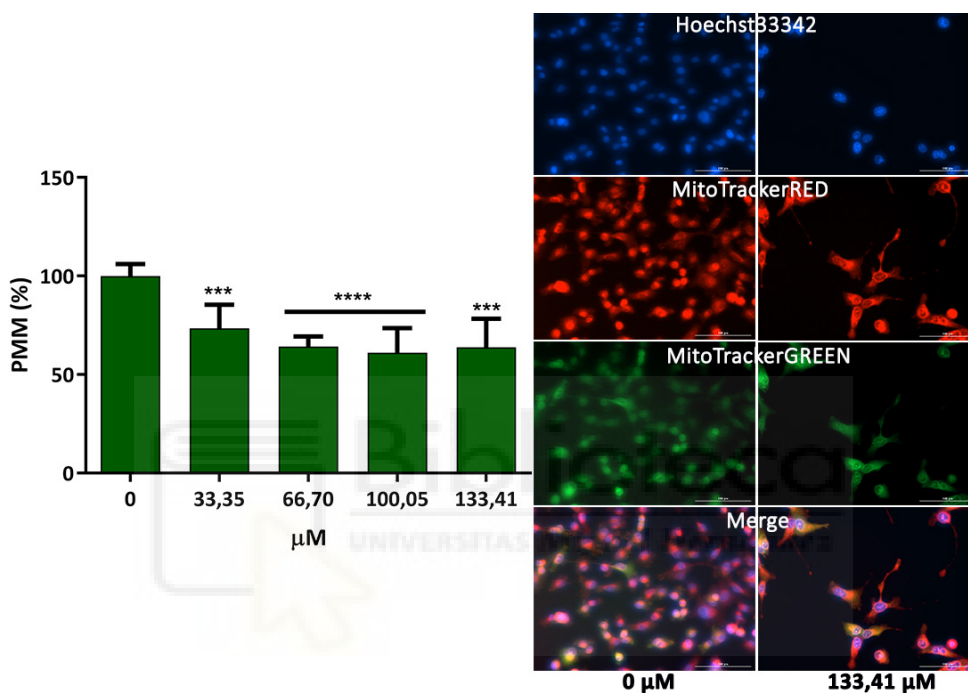
Una vez determinado que el efecto citotóxico se debe a una muerte por apoptosis se procedió a determinar el potencial de membrana mitocondrial ya que, como se ha comentado anteriormente, la mitocondria puede verse involucrada en los procesos apoptóticos además de influir en el bloqueo del ciclo celular. Para ello, como en los casos anteriores, se determinó el PMM por dos métodos diferentes, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Como se observa en la **Figura 80** el tratamiento con DAL511 produjo un incremento de casi el 5% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y llegando cerca del 30% a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$  según la citometría de flujo.



**Figura 80.** Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de células despolarizadas (%). \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

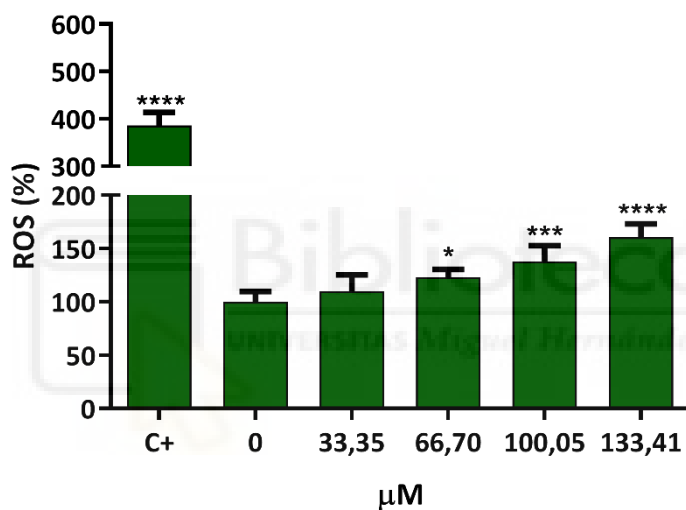
Según la microscopía de fluorescencia (**Figura 81**) se produjo un descenso del PMM de casi el 30% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y casi del 40% para la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ , de manera que ambas medidas coinciden en que se produce una despolarización de la membrana mitocondrial.



**Figura 81.** Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje del potencial de membrana mitocondrial (%). \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Por último, y al igual que con las líneas celulares anteriores, se determinó la capacidad de la mezcla DAL511 de aumentar la producción de ROS puesto que podría estar tener relación con el daño mitocondrial debido al carácter prooxidante que pueden presentar en ocasiones los polifenoles.

Como se observa en la **Figura 82** se produjo una respuesta dosis-dependiente con un incremento de cerca del 10% en la producción de ROS con la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$  llegando hasta el 60% con la concentración más alta, 133,41  $\mu\text{M}$ .



**Figura 82.** Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama TNBC MDA-MB-231. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la generación de ROS intracelular mediante la sonda H2DCF-DA y el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de ROS (%). \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

## 4.8.Mecanismo de acción de la mezcla DAL en un modelo de metástasis cerebral procedente de cáncer de mama de subtipo TNBC

### 4.8.1.Determinación del efecto antiproliferativo

En último lugar dentro del presente capítulo, se estudió el efecto antiproliferativo de la mezcla DAL511 en la línea celular MDA-MB-231-BR tras 24 horas de tratamiento. Esta líneas es una línea de metástasis cerebral originada a partir de la línea MDA-MB-231 estudiada en la anterior sección. Así mismo, y de manera similar a anteriores secciones, se estudió también en una línea celular de tejido sano, en este caso la línea celular THV de astrocitos humanos.

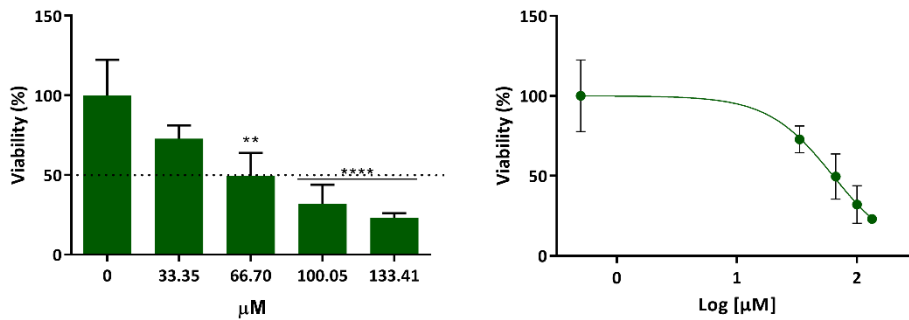
Los resultados muestran un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de la línea MDA-MB-231-BR cuando son tratadas con DAL511 y dicho efecto, aunque se puede apreciar también en la línea control THV, es más acusado en la línea tumoral (**Figura 83**).

La mezcla DAL511 presentó una  $IC_{50}$  de  $63,37 \pm 10,46 \mu M$  en la línea celular MDA-MB-231-BR frente a la  $IC_{50}$  de  $141,2 \pm 13,15 \mu M$  en MCF10A por lo que su IT fue de 2,23, considerándose por tanto de índice terapéutico estrecho (**Tabla 13**).

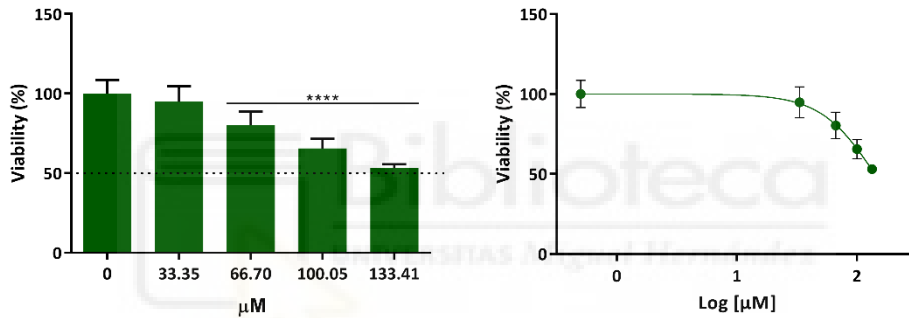
	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	IT
MDA-MB-231-BR	$63,37 \pm 10,46$	2,23
MCF10A	$141,2 \pm 13,15$	

**Tabla 13.** Valores de  $IC_{50} \pm SD$  (n=6) tras 24 horas de tratamiento y del índice terapéutico de DAL511 en MDA-MB-231-BR

### MDA-MB-231-BR



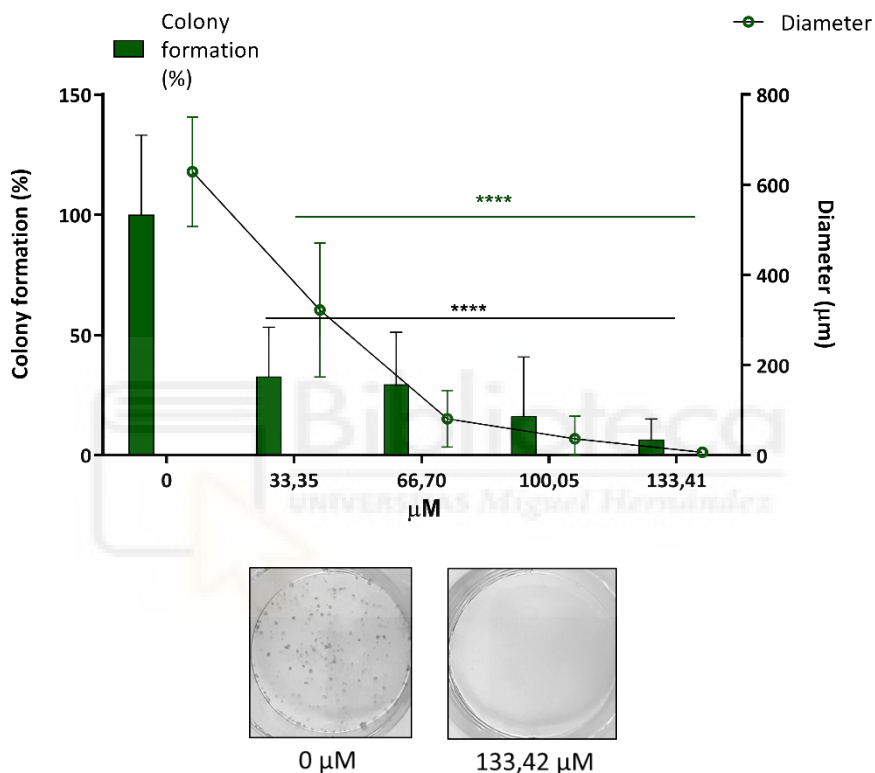
### THV



**Figura 83.** Efecto de la mezcla DAL511 en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR y la línea control sana THV. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41 μM) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el conteo de núcleos con la sonda Hoechst 33342. Los valores se presentan como porcentaje de viabilidad celular (%). \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0 μM).

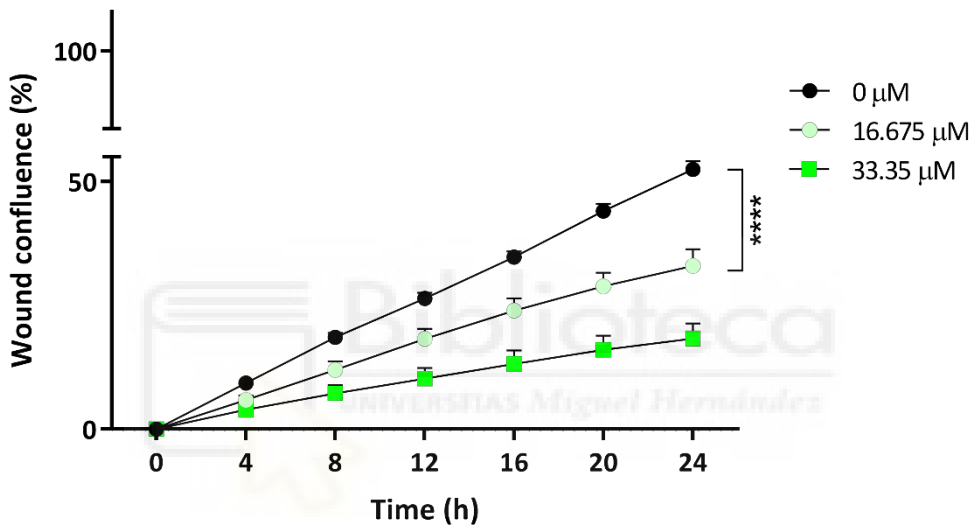
Tras observar el efecto antiproliferativo de la mezcla DAL511 se continuó estudiando el efecto de esta sobre las capacidades funcionales de las células tumorales, formar colonias, migrar e invadir.

En cuanto a la capacidad clonogénica (**Figura 84**), determinada mediante el ensayo de formación de colonias, se observó una disminución de más del 80% en el número de colonias y de más del 90% en su tamaño a la concentración del DAL511 más alta probada, 133,42  $\mu\text{M}$ .



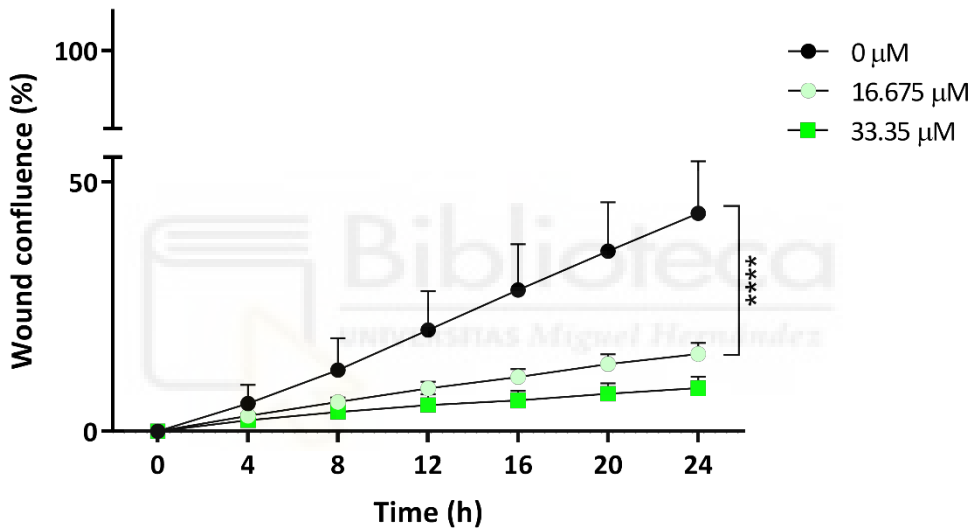
**Figura 84.** Efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad clonogénica la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células se incubaron con medio de cultivo completo durante 7 días y se determinó la capacidad de formación de colonias mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de formación de colonias (%) y como el diámetro medio de las colonias ( $\mu\text{m}$ ). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ) (Verde-Diámetro, Negro-%Formación de colonias).

La capacidad migratoria (**Figura 85**), estudiada con el ensayo de wound healing o cierre de herida, presentó un efecto más pronunciado, y se analizaron solo las concentraciones 16,675  $\mu\text{M}$  y 33,35  $\mu\text{M}$  ya que concentraciones superiores provocaban el retraimiento del borde de la herida impidiendo su análisis, y se vio reducida en más un 20% a la concentración más baja ensayada, 16,675  $\mu\text{M}$ , y en más del 40% a la concentración más alta, 33,35  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 85.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la migración celular mediante el ensayo de wound healing la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (16,675-33,35  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%).\*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

En cuanto a la invasión (**Figura 86**), se estudió por el mismo método que la migración pero en presencia de matrigel recreando la matriz extracelular, y al igual que ocurrió con la migración, se analizaron solo las concentraciones 16,675  $\mu\text{M}$  y 33,35  $\mu\text{M}$  ya que concentraciones superiores provocaban el retraimiento del borde de la herida impidiendo su análisis. Se observó una reducción cercana al 30% a la concentración más baja ensayada, 16,675  $\mu\text{M}$ , y de casi el 40% a la concentración más alta, 33,35  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de tratamiento.



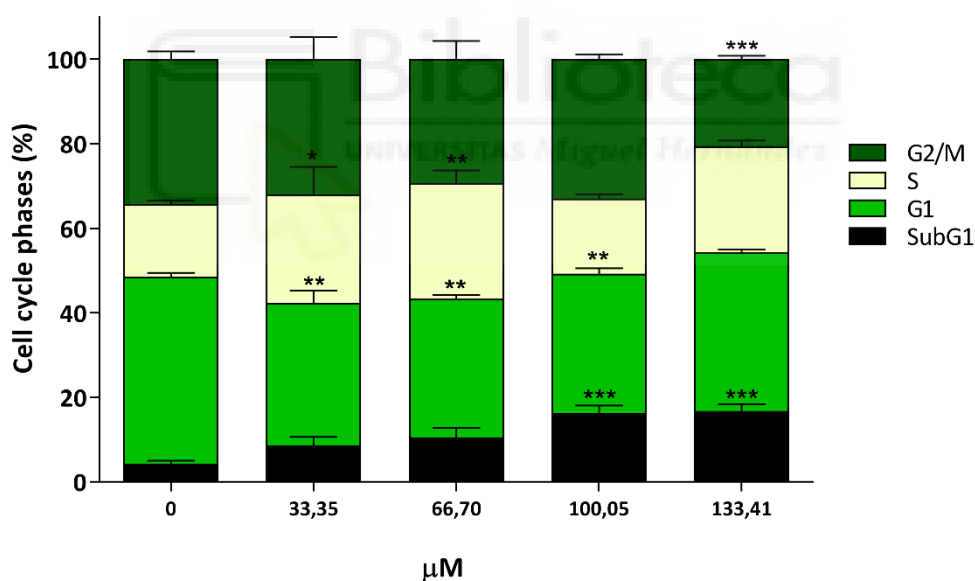
**Figura 86.** Estudio del efecto de la mezcla DAL511 en la invasión celular mediante el ensayo de wound healing con matrigel la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (16,675-33,35  $\mu\text{M}$ ) disueltas en matrigel durante 24 horas. Durante el tratamiento se realizaron fotografías a diferentes tiempos mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode. Los valores se presentan como porcentaje de confluencia en la herida (%).\*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).



## 4.8.2. Determinación del mecanismo de muerte celular

Una vez estudiado los efectos antiproliferativos y de inhibición para la capacidad de formación de colonias, de migración e invasión de la mezcla DAL511 en la línea celular MDA-MB-231-BR se procedió, de manera similar a lo hecho con las anteriores líneas celulares, a caracterizar dicho efecto antiproliferativo estudiando su mecanismo de acción.

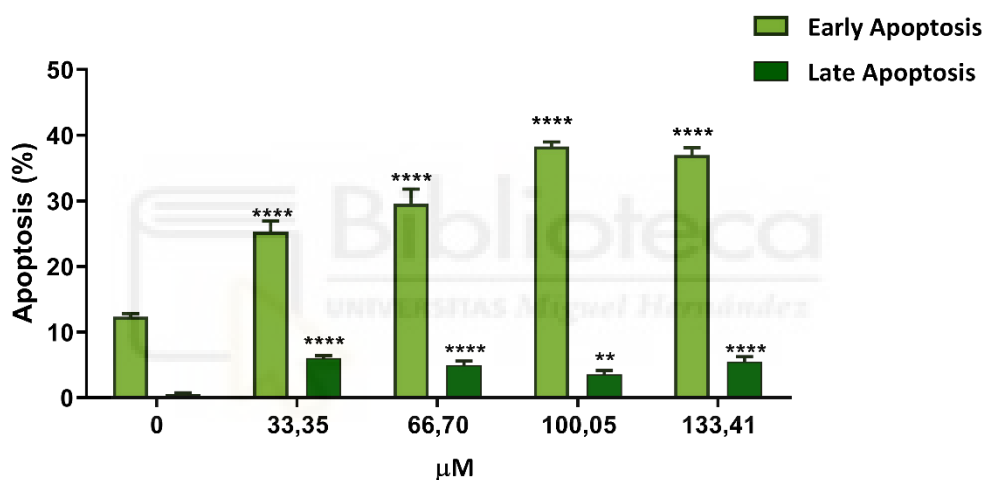
En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del ciclo celular en células tratadas con la mezcla DAL511 a diferentes concentraciones (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24h. Como se observa en la **Figura 87** se produce un aumento significativo de la fase subG1 llegando hasta un 15% a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ .



**Figura 87.** Efecto de la mezcla DAL511 sobre el ciclo celular la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de las fases del ciclo celular (%). \*( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Estos resultados hacen pensar que existe un efecto citotóxico que podría deberse a apoptosis, por ello el siguiente paso fue detectar la apoptosis mediante marcaje con Anexina-V. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. El porcentaje de apoptosis se cuantificó tanto a nivel basal como tras la adición de los tratamientos.

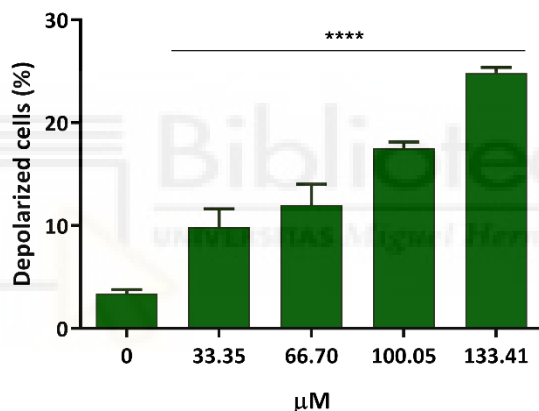
Como se puede observar en la **Figura 88** se produce un incremento significativo de la apoptosis temprana de un 15% y del 5% en la apoptosis tardía con la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ .



**Figura 88.** Determinación de apoptosis mediante Anexina-V en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el ciclo celular se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de apoptosis temprana y tardía (%). \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

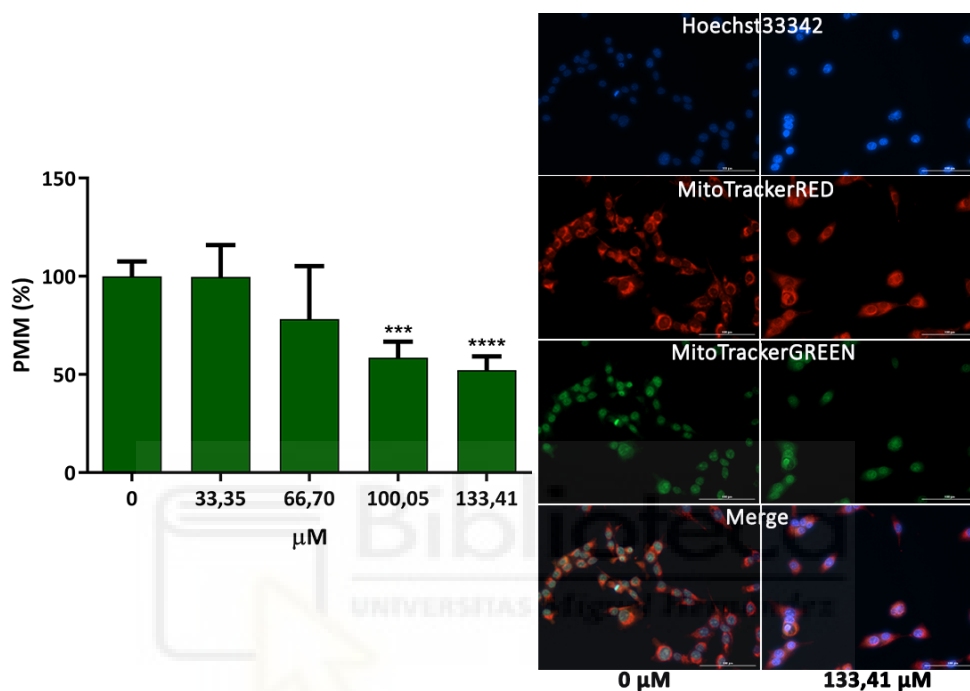
Una vez determinado que el efecto citotóxico se debe a una muerte por apoptosis se procedió a determinar el potencial de membrana mitocondrial ya que la mitocondria puede verse involucrada en los procesos apoptóticos además de influir en el bloqueo del ciclo celular. Para ello, como en el resto de modelos previamente estudiados, se determinó el PMM por dos métodos diferentes, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Como se observa en la **Figura 89** el tratamiento con DAL511 produce un incremento de la despolarización de más del 5% a la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$ , y llegando cerca del 30% a la concentración más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$  según la citometría de flujo.



**Figura 89.** Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Muse Cell Analyzer. Los valores se presentan como porcentaje de células despolarizadas (%). \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

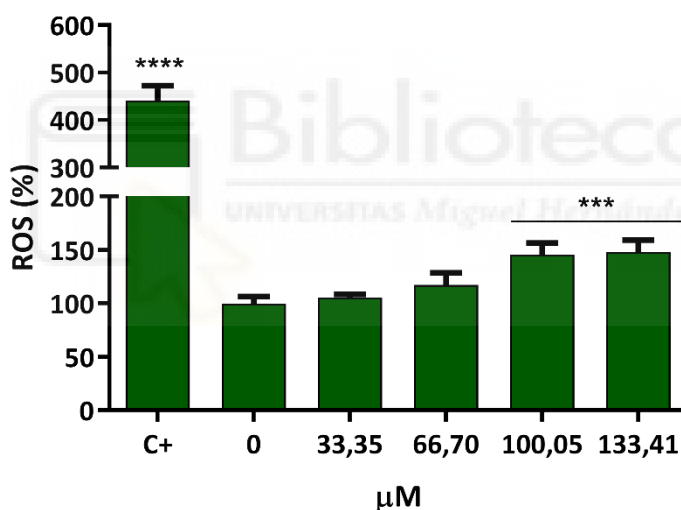
Según la microscopía de fluorescencia (**Figura 90**) se produce un descenso del PMM de casi el 50% a la más alta probada, 133,41  $\mu\text{M}$ , de manera que ambas medidas coinciden en que se produce una despolarización de la membrana mitocondrial.



**Figura 90.** Efecto de la mezcla DAL511 en el potencial de membrana mitocondrial en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, el porcentaje de células despolarizadas se determinó mediante el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multimode. Los valores se presentan como porcentaje del potencial de membrana mitocondrial (%). \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

De manera similar a lo hecho con los anteriores modelos celulares, se pasó en último lugar a estudiar la capacidad de la mezcla DAL511 de modificar la presencia de ROS puesto que, como se ha explicado anteriormente, esto podría estar tener relación con el daño mitocondrial debido al carácter prooxidante que pueden presentar en ocasiones los polifenoles.

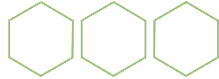
Como se observa en la **Figura 91** se produjo un incremento dosis-dependiente, observándose un aumento de cerca del 5% en la producción de ROS con la concentración más baja probada, 33,35  $\mu\text{M}$  llegando hasta el 50% con la concentración más alta, 133,41  $\mu\text{M}$ .



**Figura 91.** Efecto de la mezcla DAL511 en la producción de ROS en la línea de cáncer de mama TNBC metastásica de cerebro MDA-MB-231-BR. Las células se trataron con diferentes concentraciones de DAL511 (33,35-133,41  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento se determinó la generación de ROS intracelular mediante la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  y el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multimode. Los valores se presentan como porcentaje de ROS (%). \*\*\* ( $p < 0,001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

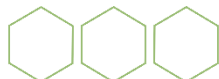
	MCF7	JIMT-1	MDA-MB-231	MDA-MB-231-BR
IC <sub>50</sub> (μM)	57,22±10,89	86,69±16,38	61,24±18,63	63,37±10,46
IT	2,46 / Estrecho	1,63/ No seguro	2,30 / Estrecho	2,23 / Estrecho
Formación de colonias	Inhibición de número y tamaño	Inhibición de número y tamaño	Inhibición de número y tamaño	Inhibición de número y tamaño
Migración	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición
Invasión	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición
Citostático	Bloqueo en fase S	Bloqueo en fase G2/M	Alteración del ciclo	Alteración del ciclo
Citotóxico	Aumento de fase subG1	Aumento de fase subG1 leve	Aumento de fase subG1	Aumento de fase subG1
Apoptosis	Temprana y tardía	Temprana y tardía	Temprana y tardía	Temprana y tardía
Daño	Descenso de PMM	Descenso de PMM leve	Descenso de PMM	Descenso de PMM
ROS	Aumento	No efecto	Aumento dosis-dependiente	Aumento dosis-dependiente
Mecanismo de muerte	Apoptosis por vía mitocondrial con aumento de ROS y bloqueo celular en fase S	Bloqueo del ciclo en fase G2/M y apoptosis por vía no mitocondrial	Apoptosis por vía mitocondrial con aumento de ROS	Apoptosis por vía mitocondrial con aumento de ROS

Tabla 14. Resumen de resultados de los ensayos celulares para DAL511 en modelos de cáncer de mama



## **Capítulo III:**

**Absorción intestinal *in vitro* y  
estudio del transporte a través  
de la barrera hematoencefálica  
mediante un modelo  
matemático**







En el presente capítulo se realizó un estudio sobre la absorción intestinal de los compuestos diosmetina, apigenina y luteolina en combinación (DAL511) ya que, en el caso de administrar por vía oral un tratamiento con dichos compuestos, sería necesario que sea absorbido a nivel intestinal para llegar a su sitio de acción, las células tumorales. Dicho estudio se llevó a cabo mediante el ensayo de absorción intestinal *in vitro* con monocapas de Caco-2, ampliamente validado<sup>147,150,151</sup>, y el cálculo de la permeabilidad aparente y el flujo de salida (Efflux ratio), el cual permite estimar el principal tipo de transporte, para cada compuesto.

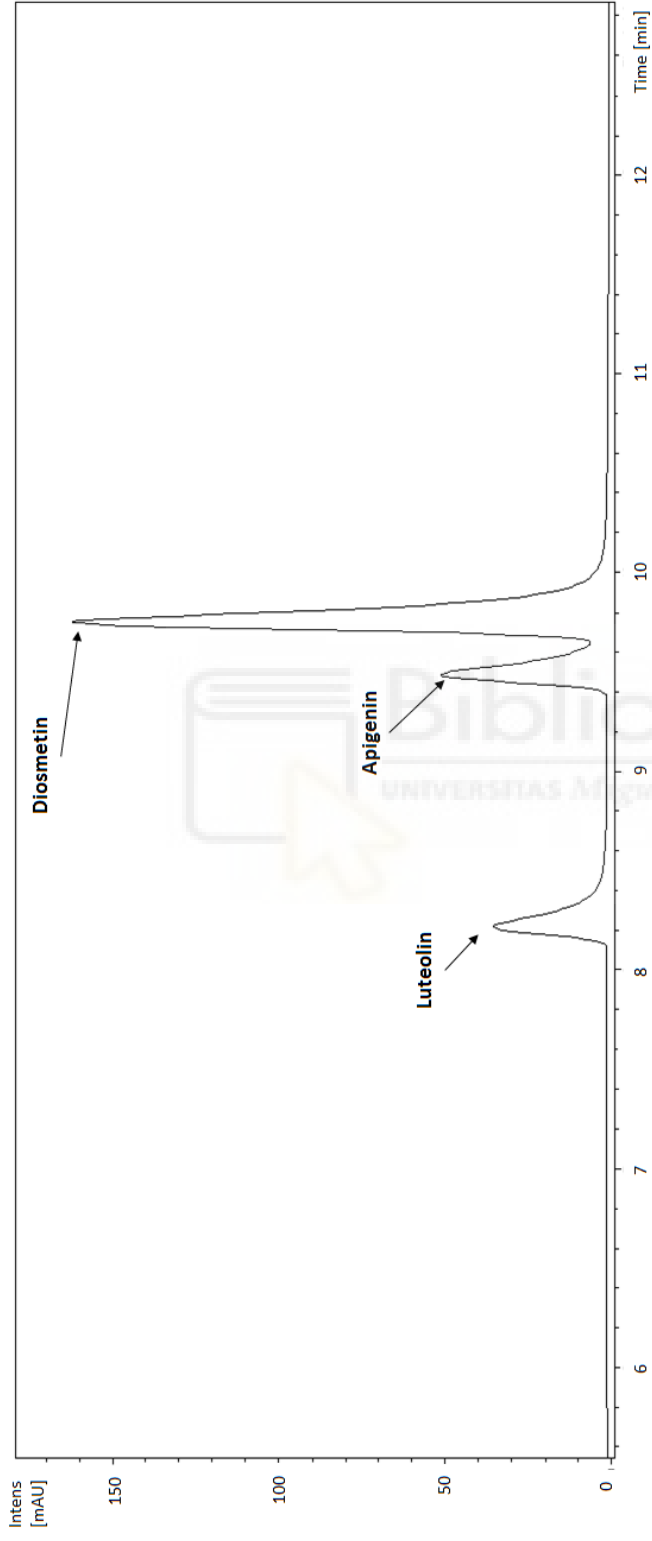
En cuanto al transporte a través de la barrera hematoencefálica, éste presenta una gran relevancia clínica en el tratamiento de cualquier enfermedad cerebral. Dicha barrera ejerce normalmente de protección para el cerebro, provocando grandes dificultades a la hora de elegir tratamientos, ya que la mayoría de fármacos no consiguen atravesarla. Por ello, con el objetivo de conocer el potencial para atravesar la BHE de las flavonas de la mezcla DAL511 se realizó una aproximación matemática a partir de los valores de permeabilidad aparente obteniendo el  $P_{active}$ , un parámetro que presenta buena correlación con el ensayo de absorción hematoencefálica *in situ*.

## 4.9. Determinación de los valores de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ )

Para determinar la concentración de los compuestos previamente identificados por HPLC en las muestras procedentes de la cámara apical (AP) y basolateral (BL) (**Figura 92**) se emplearon las ecuaciones de regresión lineal incluidas en la **Tabla 15**, tal y como se describe en el apartado de Metodología, y dichos valores se emplearon para obtener los valores de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ). En la **Tabla 16** y la **Figura 92** se muestran los valores para los tres compuestos de la mezcla DAL511 estudiada (diosmetina, luteolina y apigenina) y ambas direcciones analizadas, AP-BL y BL-AP, que muestran que los tres compuestos son absorbidos de manera moderada. Además, se calculó el Efflux ratio (Er) o flujo de salida, que permite conocer el posible tipo de transporte a partir de los valores de  $P_{app}$  y que muestran que los compuestos se absorben principalmente por difusión pasiva (**Tabla 17 y Figura 93**).

Compuesto	RT (min)	LOD ( $\mu\text{M}$ )	LOQ ( $\mu\text{M}$ )	Rango lineal ( $\mu\text{M}$ )	Ecuación de regresión lineal	$r^2$
Luteolina	8,3	0,098	0,391	0,391-25	$y = 12,57x + 5,293$	0,9977
Apigenina	9,5	0,098	0,391	0,391-25	$y = 15,493x + 18,671$	0,9976
Diosmetina	9,8	0,098	0,391	0,391-25	$y = 17,139x + 10,399$	0,9969

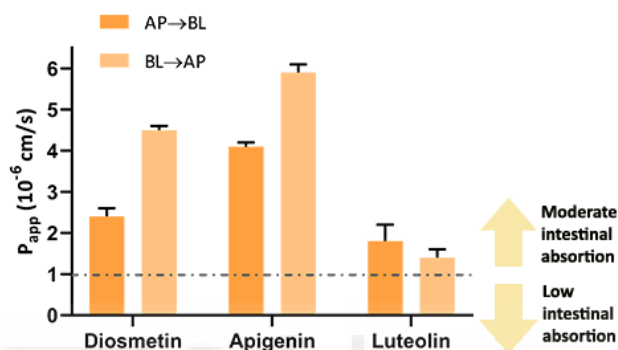
**Tabla 15.** Parámetros analíticos de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación de luteolina, apigenina y diosmetina. RT: tiempo de retención (*del inglés retention time*), LOD: límite de detección (*del inglés limit of detection*), LOQ: límite de cuantificación (*del inglés limit of quantification*)



**Figura 92.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla DAL511. Los picos corresponden a luteolina, apigenina y diosmetina de izquierda a derecha.

P <sub>app</sub> cm/s 10 <sup>-6</sup> ± SD					
Diosmetina		Apigenina		Luteolina	
AP→BL	BL→AP	AP→BL	BL→AP	AP→BL	BL→AP
2,4 ± 0,2	4,5 ± 0,1	4,1 ± 0,1	5,9 ± 0,2	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,2

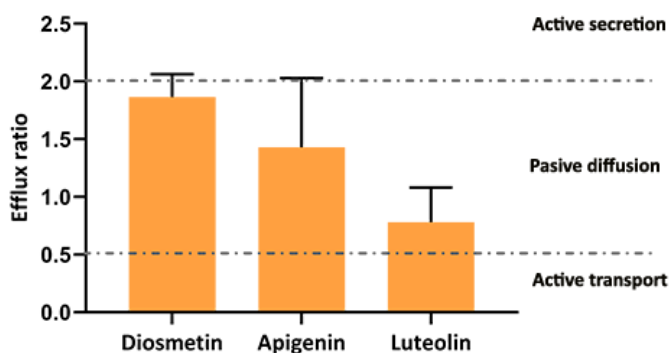
**Tabla 16.** Valores de P<sub>app</sub> de los compuestos (cm/s) de la mezcla DAL511 en ambas direcciones estudiadas. Los valores representan la media (n=6) ± desviación estándar (SD).



**Figura 94.** Valores Efflux ratio (P<sub>app</sub> BL→AP / P<sub>app</sub> AP→BL)

Efflux ratio		
Diosmetina	Apigenina	Luteolina
1,8645±0,2	1,4293±0,6	0,7792±0,3

**Tabla 17.** Valores de Efflux ratio (Er) calculado a partir de las P<sub>app</sub> (P<sub>app</sub> AP→BL/P<sub>app</sub> BL→AP) Er<0,5 Transporte activo entrada, 0,5>Er<2 Difusión pasiva Er>2 Eflujo



**Figura 93.** Valores de P<sub>app</sub> expresados como cm/s 10<sup>-6</sup> ± SD n=3

## 4.10. Determinación de la absorción hematoencefálica derivada de la $P_{app}$

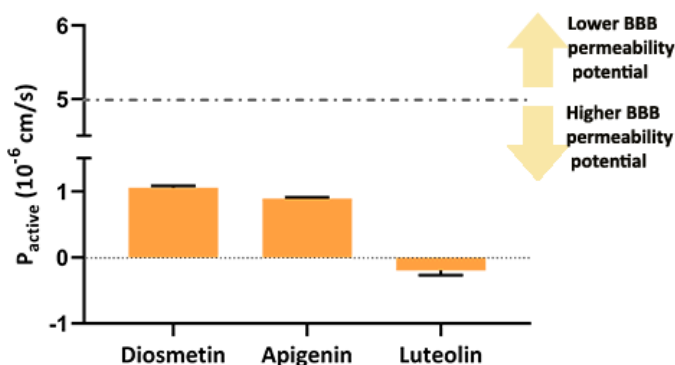
Una vez determinados los valores de  $P_{app}$  y del Efflux ratio para cada uno de los compuestos de la mezcla DAL511 se comprobó que los datos eran válidos para aplicar la fórmula y calcular el  $P_{active}$  como se ha descrito en el apartado de Metodología (**Ecuación 8**), es decir, que los valores de Er sean inferiores a 2, y se obtuvieron los datos que se muestran en la **Tabla 18** y la **Figura 94** siendo los tres compuestos buenos candidatos para atravesar la BHE ya que presentan valores inferiores a  $5 \times 10^{-6}$  cm/s.

$$P_{active} = \frac{P_{app}^{BL \rightarrow AP} - P_{app}^{AP \rightarrow BL}}{2}$$

**Ecuación 8.** Cálculo de la permeabilidad activa

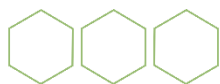
$P_{active}$ cm/s $10^{-6} \pm SD$		
Diosmetina	Apigenina	Luteolina
1,05 ± 0,03	0,89 ± 0,02	-0,20 ± 0,07

**Tabla 18.** Valores de  $P_{active}$  para los compuestos de la mezcla DAL511



**Figura 95.** Valores de  $P_{active}$  expresados como cm/s  $10^{-6} \pm SD$





# Capítulo IV:

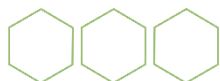
**Aditividad, sinergia y**

**antagonismo entre la capacidad  
antiproliferativa de diosmetina,**

**apigenina y luteolina en**

**modelos celulares de cáncer de**

**mama**







En el presente capítulo se estudiaron los posibles efectos sinérgicos entre los tres compuestos de la mezcla DAL511, diosmetina, apigenina y luteolina en combinaciones dobles y triple para buscar ratios de combinación que permitan utilizar dosis inferiores de los compuestos y encontrar una mejor proporción de los compuestos que maximizara la acción de la mezcla. Los efectos sinérgicos son de relevancia farmacológica en los casos donde se busca disminuir los efectos adversos, ya que permiten utilizar dosis menores sin perder efectividad, como ocurre en los tratamientos oncológicos.

#### 4.11. Combinaciones dobles

Dado que se han utilizado tres compuestos, existen tres combinaciones binarias posibles para el estudio de las posibles sinergias. Estas fueron utilizadas en diferentes proporciones o ratios seleccionadas con el objetivo de determinar los valores de IC<sub>50</sub>, para cada proporción y combinación, en las dos líneas celulares utilizadas (MCF7 y JIMT-1) y obtener los valores de CI mediante el software Compusyn. Una vez obtenidos, y junto con los valores para los compuestos puros, se utilizaron para construir los respectivos isobogramas (**Figura 96**) y determinar los valores de FICI.

Como se observa en la **Tabla 19** para la línea celular MCF7 la mayoría de ratios de las combinaciones Diosmetina-Apigenina (D-A) y Apigenina-Luteolina (A-L) presentan antagonismo excepto para los ratios 1:2 y 5:4 de la combinación D-A y 4:1 de la combinación A-L. Por el contrario, la combinación Diosmetina-Luteolina (D-L) presenta sinergia excepto la ratio 5:3 que presenta antagonismo según el CI y aditividad según el FICI. En cuanto a JIMT-1 (**Tabla 20**) tiene una tendencia similar predominando el antagonismo en D-A y A-L excepto por los ratios 3:2, 4:1 y 5:2, 5:3 y 6:1 mientras que para la combinación D-L todos los ratios presentan sinergia excepto 5:1, 5:3 y 6:1 que presentan antagonismo.

MCF7						
Combinación	Ratio	IC <sub>50</sub> (μM)			CI	FICI
		D	A	L		
		107,30	38,45	64,79		
D-A	1:1	36,47	36,47		1,28	1,29
	1:2	<1	<1		<0,1	<0,1
	2:1	84,38	42,19		1,73	1,88
	3:1	141,20	47,07		2,21	2,54
	3:2	60,04	40,02		1,53	1,60
	4:1	208,91	52,23		2,76	3,31
	5:1	>500	>500		>10	>10
	5:2	68,53	27,41		1,21	1,35
	5:3	344,45	206,67		8,09	8,59
	5:4	<1	<1		<0,1	<0,1
	6:1	>500	>500		>10	>10
	D-L	1:1	34,10		34,10	0,69
1:2		20,68		41,36	0,72	0,83
1:3		15,75		47,25	0,78	0,88
1:4		14,88		59,53	0,95	1,06
2:1		34,82		17,41	0,46	0,59
2:3		27,37		41,06	0,75	0,89
3:1		63,14		21,05	0,68	0,91
3:2		56,17		37,45	0,87	1,10
4:1		57,99		14,50	0,55	0,76
5:1		93,45		18,69	0,82	1,16
5:2		48,58		19,43	0,57	0,75
5:3		87,63		52,58	1,28	1,63
5:4		48,64		38,91	0,85	1,05
6:1		106,77		17,79	0,89	1,27
A-L	1:1		50,27	50,27	2,20	2,08
	1:2		34,04	68,08	1,98	1,94
	1:3		28,04	84,13	2,04	2,03
	1:4		23,40	93,59	2,04	2,05
	2:1		37,97	18,98	1,39	1,28
	2:3		42,30	63,44	2,16	2,08
	3:1		64,34	21,45	2,20	2,00
	3:2		58,30	38,86	2,27	2,12
	4:1		0,92	0,23	0,03	0,03

**Tabla 19.** Resultados de CI y FICI para las combinaciones dobles en la línea celular MCF7. En las columnas de concentración de IC<sub>50</sub> se remarcan en verde los valores inferiores y en rojo los superiores a la IC<sub>50</sub> del compuesto puro. En las columnas de CI y FICI se remarcan en verde los valores de sinergia, en amarillo los de aditividad y en rojo los de antagonismo.

JIMT-1						
Combinación	Ratio	IC <sub>50</sub> (µM)			CI	FICI
		Diosmetina	Apigenina	Luteolina		
		129,40	91,33	86,35		
D-A	1:1	115,36	115,36		1,29	4,08
	1:2	123,40	246,81		2,31	7,57
	2:1	237,02	118,51		1,74	5,29
	3:1	214,60	71,53		1,30	3,86
	3:2	102,72	68,48		0,88	2,74
	4:1	<1	<1		<0,1	<0,1
	5:1	>500	>500		>10	>10
	5:2	72,10	28,84		0,47	1,42
	5:3	74,11	44,47		0,60	1,85
	5:4	110,23	88,18		1,06	3,32
	6:1	5,25	0,87		0,03	0,07
D-L	1:1	57,13		57,13	0,45	1,41
	1:2	39,72		79,44	0,48	1,60
	1:3	25,55		76,64	0,42	1,42
	1:4	34,71		138,85	0,72	2,47
	2:1	41,69		20,84	0,24	0,71
	2:3	90,48		135,72	0,91	2,94
	3:1	58,48		19,49	0,29	0,85
	3:2	129,70		86,47	0,83	2,54
	4:1	68,78		17,19	0,32	0,91
	5:1	>500		>500	>10	>10
	5:2	134,98		53,99	0,71	2,09
	5:3	226,01		135,61	1,39	4,20
	5:4	118,06		94,45	0,83	2,56
	6:1	795,87		132,64	3,40	9,46
A-L	1:1		421,65	421,65	5,03	17,47
	1:2		191,83	383,67	3,12	10,91
	1:3		24,26	72,79	0,50	1,75
	1:4		436,93	>500	>10	>10
	2:1		>500	>500	>10	>10
	2:3		>500	>500	>10	>10
	3:1		115,81	38,60	1,05	3,61
	3:2		93,64	62,43	0,98	3,40
	4:1		>500	>500	>10	>10

**Tabla 20.** Resultados de CI y FICI para las combinaciones dobles en la línea celular JIMT-1. En las columnas de concentración de IC<sub>50</sub> se remarcan en verde los valores inferiores y en rojo los superiores a la IC<sub>50</sub> del compuesto puro. En las columnas de CI y FICI se remarcan en verde los valores de sinergia, en amarillo los de aditividad y en rojo los de antagonismo.

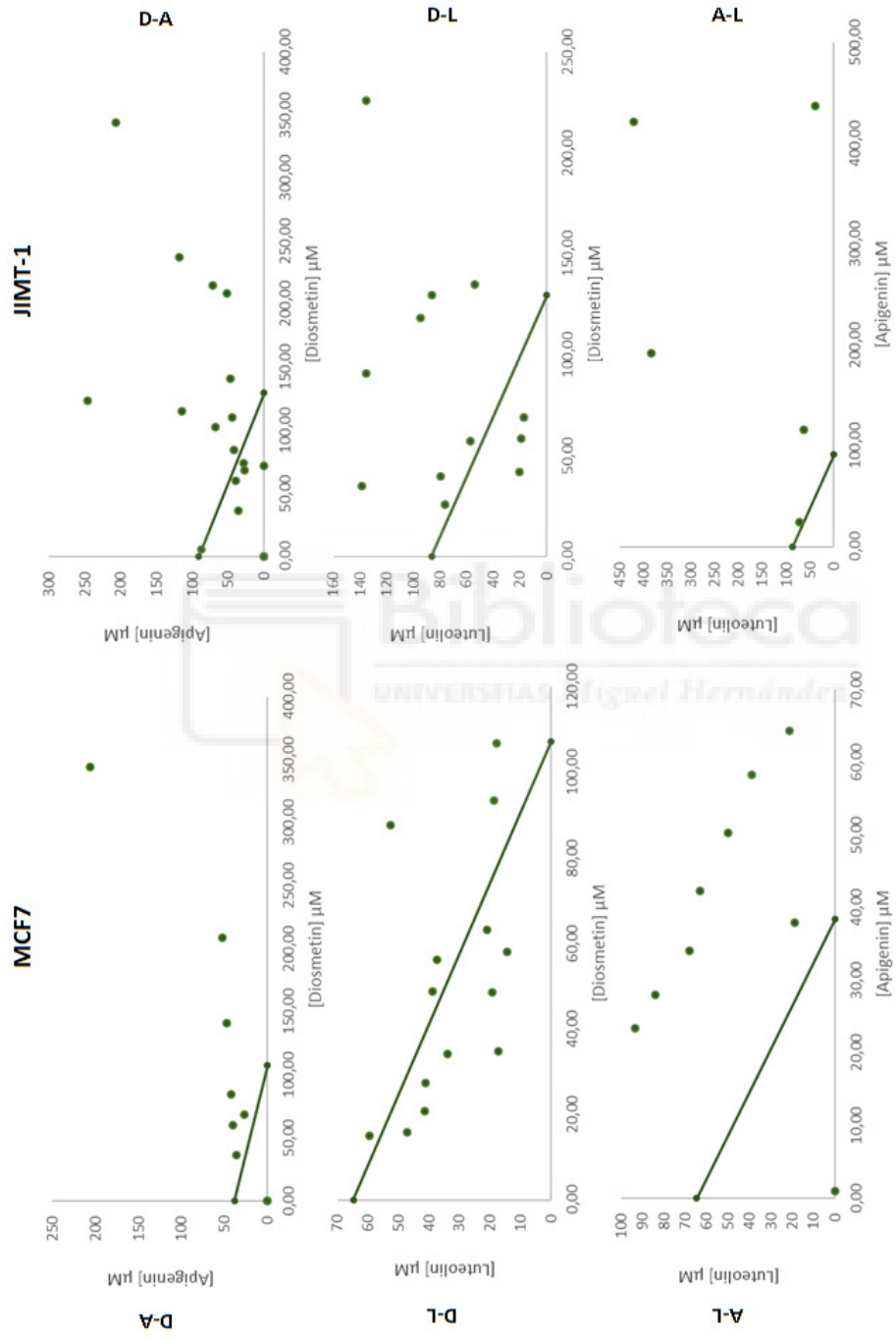


Figura 96. Isobologramas para las combinaciones dobles en las líneas celulares MCF7 (Derecha) y JIMT-1 (Izquierda).

## 4.12. Combinación triple

En este caso se utilizaron combinaciones triples en diferentes proporciones o ratios seleccionadas con el objetivo de determinar experimentalmente los valores de IC<sub>50</sub> para cada proporción y combinación en cada una de las líneas celulares utilizadas. Una vez obtenidos dichos valores, y junto con los valores de las IC<sub>50</sub> para los compuestos puros, se utilizaron para construir los correspondientes isobogramas de las mezclas triples (**Figura 97** y **Figura 98**), y por tanto en 3D, así como para determinar los valores de FICI, tal y como se ha descrito anteriormente con el objetivo de evaluar cuantitativamente la sinergia o antagonismo (**Tabla 21** y **Tabla 22**). Los valores de FICI indican el tipo de interacción que se establece entre dos compuestos, sinergia, aditividad o antagonismo

Como se observa en la tabla para la línea celular MCF7 solo el ratio 6:4:1 muestra sinergia mientras que el resto de ratios muestran antagonismo, aunque teniendo en cuenta el FICI algunos se corresponden a aditividad, 2:1:1, 2:1:3, 2:2:1, 2:3:1, 3:1:2, 3:1:3, 3:2:1, 4:1:1, 4:1:2 y 4:2:1. En cuanto a la línea celular JIMT-1 tiene una tendencia similar predominando el antagonismo pero sí que se observa sinergia en más ratios, solo si se tienen en cuenta el CI, 1:1:2, 2:3:1, 3:1:3, 3:3:1, 4:2:1, 5:1:2, 5:1:3, 5:1:4, 5:2:1, 5:2:2, 5:2:3, 5:3:1 y 6:2:1.

MCF7						
Combinación	Ratio	IC <sub>50</sub> (μM)			CI	FICI
		Diosmetina	Apigenina	Luteolina		
		107,30	38,45	64,79		
D-A-L	1:1:1	41,27	41,27	41,27	2,05	2,09
	2:1:1	59,79	29,90	29,90	1,66	1,80
	2:1:2	60,01	30,01	60,01	2,10	2,27
	2:1:3	42,93	21,47	64,40	1,81	1,95
	2:1:4	40,35	20,17	80,70	1,99	2,15
	2:2:1	31,67	31,67	15,84	1,34	1,36
	2:2:3	37,14	55,71	37,14	2,39	2,37
	1:1:2	30,50	30,50	61,00	1,95	2,02
	2:3:1	35,21	52,81	17,60	2,01	1,97
	2:3:2	60,53	90,80	60,53	1,17	3,86
	2:3:3	45,83	68,74	68,74	3,28	3,28
	2:4:1	>500	>500	251,71	>10	>10
	3:1:1	92,53	30,84	30,84	1,90	2,14
	3:1:2	67,72	22,57	45,15	1,71	1,92
	3:1:3	59,39	19,80	59,39	1,79	1,98
	3:2:1	53,92	35,95	17,97	1,63	1,71
	3:2:2	63,27	42,18	42,18	2,22	2,34
	3:2:3	66,86	44,58	66,86	2,67	2,81
	3:3:1	53,71	53,71	17,90	2,15	2,17
	3:3:2	63,27	63,27	42,18	2,84	2,89
	4:1:1	79,83	19,96	19,96	1,34	1,57
	4:1:2	76,61	19,15	38,31	1,57	1,80
	4:1:4	101,40	25,35	101,40	2,81	3,17
	4:2:1	49,44	24,72	12,36	1,19	1,29
	4:4:1	378,05	378,05	94,51	>10	>10
	5:1:1	154,18	30,84	30,84	2,26	2,71
	5:1:2	316,47	63,29	126,59	5,55	6,55
	5:1:3	101,57	20,31	60,94	2,07	2,42
	5:1:4	132,58	26,52	106,07	3,09	3,56
	5:2:1	276,84	110,74	55,37	5,68	6,31
	5:2:2	327,68	131,07	131,07	7,67	8,49
	5:2:3	176,93	70,77	106,16	4,65	5,13
	5:2:4	94,86	37,94	75,88	2,77	3,04
	5:3:1	>500	418,23	139,41	>10	>10
	5:3:2	438,95	263,37	175,58	>10	>10
	5:3:3	131,85	79,11	79,11	4,24	4,51
5:4:1	>500	>500	>500	>10	>10	
5:4:2	>500	>500	>500	>10	>10	
5:4:4	215,74	172,59	172,59	8,82	9,16	
6:1:1	>500	103,84	103,84	8,22	>10	
6:2:1	130,15	43,38	21,69	2,35	2,68	
6:4:1	<1	<1	<1	<0,1	<0,1	

**Tabla 21.** Resultados de CI y FICI para las combinaciones triples en la línea celular MCF7. En las columnas de concentración de IC<sub>50</sub> se remarcan en verde los valores inferiores y en rojo los superiores a la IC<sub>50</sub> del compuesto solo. En las columnas de CI y FICI se remarcan en verde los valores de sinergia, en amarillo los de aditividad y en rojo los de antagonismo.

JIMT-1						
Combinación	Ratio	IC <sub>50</sub> (μM)			CI	FICI
		Diosmetina	Apigenina	Luteolina		
		129,40	91,33	86,35		
D-A-L	1:1:1	268,40	268,40	268,40	4,15	>10
	2:1:1	297,69	148,85	148,85	2,83	8,94
	2:1:2	191,48	95,74	191,48	2,24	7,23
	2:1:3	75,24	37,62	112,86	1,04	3,42
	2:1:4	84,00	42,00	168,01	1,34	4,47
	2:2:1	93,54	93,54	46,77	1,25	4,03
	2:2:3	110,46	110,46	165,69	1,95	6,46
	1:1:2	39,49	39,49	78,98	0,78	2,61
	2:3:1	39,09	58,63	19,54	0,67	2,19
	2:3:2	60,53	90,80	60,53	1,17	3,86
	2:3:3	64,17	96,26	96,26	1,38	4,59
	2:4:1	315,67	>500	157,84	6,60	>10
	3:1:1	305,75	101,92	101,92	2,30	7,07
	3:1:2	425,92	141,97	283,95	3,82	>10
	3:1:3	60,22	20,07	60,22	0,63	2,01
	3:2:1	110,85	73,90	36,95	1,11	3,53
	3:2:2	116,47	77,64	77,64	1,34	4,30
	3:2:3	106,49	70,99	106,49	1,38	4,48
	3:3:1	68,23	68,23	22,74	0,86	2,76
	3:3:2	103,64	103,64	69,09	1,45	4,73
	4:1:1	284,20	71,05	71,05	1,86	5,59
	4:1:2	>500	136,93	273,86	4,17	>10
	4:1:4	>500	318,11	1272,46	>10	>10
	4:2:1	73,83	36,91	18,46	0,62	1,93
	4:4:1	82,02	82,02	20,51	1,00	3,21
	5:1:1	223,09	44,62	44,62	1,32	3,93
	5:1:2	179,98	36,00	71,99	1,22	3,72
	5:1:3	103,80	20,76	62,28	0,80	2,47
	5:1:4	98,49	19,70	78,79	0,84	2,65
	5:2:1	91,26	36,50	18,25	0,68	2,08
	5:2:2	115,10	46,04	46,04	0,96	2,98
	5:2:3	95,53	38,21	57,32	0,88	2,77
	5:2:4	139,01	55,60	111,21	1,40	4,46
	5:3:1	105,50	63,30	21,10	0,95	2,96
	5:3:2	264,00	158,40	105,60	2,60	8,21
	5:3:3	282,01	131,56	230,93	1,51	9,61
5:4:1	164,56	131,65	32,91	1,73	5,47	
5:4:2	309,21	247,37	123,68	3,51	>10	
5:4:4	461,41	369,13	369,13	6,04	>10	
6:1:1	>500	>500	>500	>10	>10	
6:2:1	121,38	40,46	20,23	0,83	2,50	
6:4:1	138,13	92,09	23,02	1,29	4,04	

**Tabla 22.** Resultados de CI y FICI para las combinaciones triples en la línea celular JIMT-1. En las columnas de concentración de IC<sub>50</sub> se remarcan en verde los valores inferiores y en rojo los superiores a la IC<sub>50</sub> del compuesto solo. En las columnas de CI y FICI se remarcan en verde los valores de sinergia, en amarillo los de aditividad y en rojo los de antagonismo.

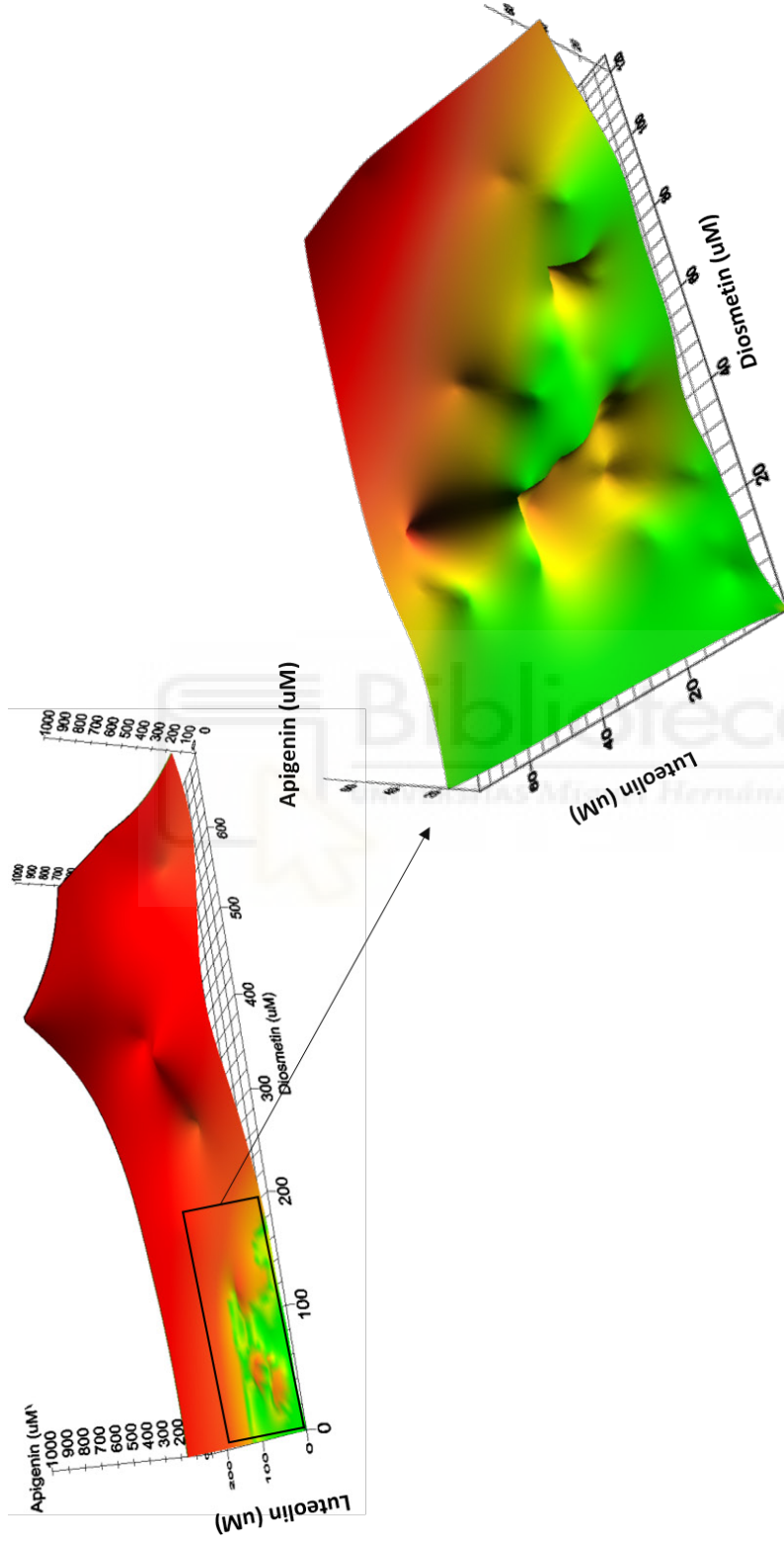


Figura 97. Isobolograma para la combinación D-A-L en la línea celular MCF7



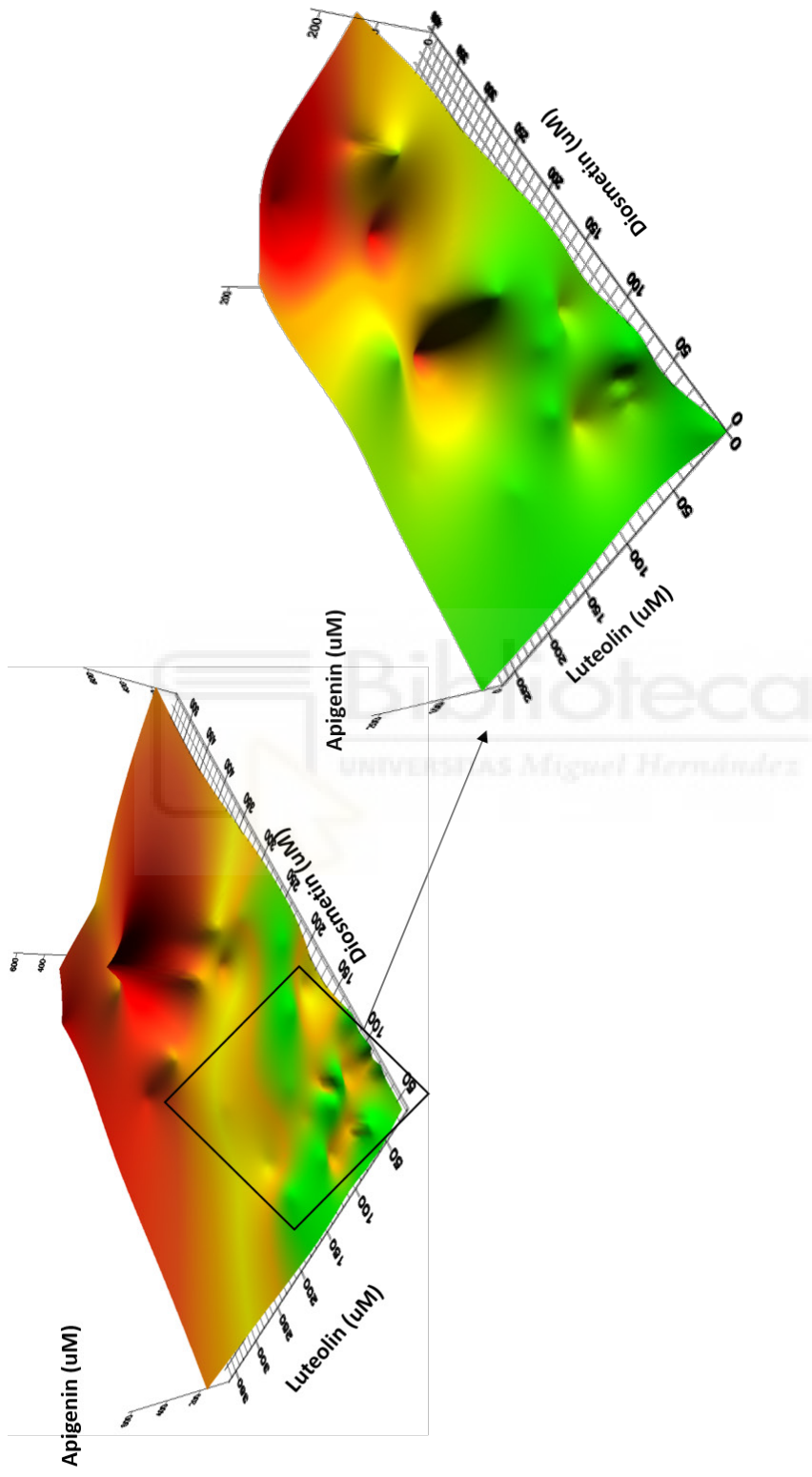


Figura 98. Isoblograma para la combinación D-A-L en la línea celular JIMT-1





Bibliotecas  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 5. Discusión



## 5.1.Optimización de la capacidad antioxidante y antiproliferativa de un extracto de hoja de olivo

Los resultados obtenidos tanto para el contenido fenólico, como para la capacidad antioxidante y la capacidad antiproliferativa en los diferentes extractos de hoja de olivo fueron inferiores a lo esperado teniendo en cuenta el valor de IC<sub>50</sub> del extracto de origen, 7 µg/mL<sup>132</sup>.

Con posterioridad a la realización de estos ensayos, el grupo colaborador de la Universidad de Granada, grupo de procedencia de los extractos, realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de la composición de los diferentes extractos (**Tabla 9**)<sup>149</sup>. Con estos resultados se realizó el análisis estadístico mediante un modelo lineal generalizado para determinar los posibles candidatos de la actividad tanto antioxidante como antiproliferativa, en el caso de la actividad antiproliferativa en JIMT-1 se estimó que los compuestos que potencialmente contribuirían más son el acetoxipinorresinol y el ácido ursólico, y en el caso de la actividad antioxidante se estimó que los compuestos que potencialmente tendrían mayor contribución en son la vainillina y la oleuropeina isómero 1.

Los resultados obtenidos de dicha caracterización explican los bajos resultados de capacidad antiproliferativa obtenidos para los diferentes extractos de hoja de olivo si se consideran a la diosmetina, la apigenina y la luteolina como responsables de la misma en el extracto de origen, teniendo en cuenta los resultados previos del grupo, ya que al ser muy baja o nula su concentración el efecto observado es ejercido por compuestos con menor potencial antiproliferativo, el acetoxipinorresinol y el ácido ursólico en este caso.

Es posible que para obtener mejores resultados sea necesario realizar un proceso de extracción orientado a aumentar el contenido en estos compuestos, por ejemplo, valiéndose de su carácter apolar se podría separar el extracto en fracciones según su polaridad para aumentar la concentración de estas flavonas.

Pese a que, al no existir réplicas de los diferentes extractos, no se posee la potencia estadística necesaria para identificar estadísticamente las mejores condiciones, sin embargo, sí que se observa una tendencia en el efecto de la estacionalidad de la recogida de la hoja. Las mejores condiciones por orden otoño, verano, primavera e invierno.

Estos resultados se explican si tenemos en cuenta el ciclo bienal del olivo y lo relacionamos con el aumento progresivo del contenido fenólico. Como se observa en la **Figura 22** los meses de invierno son los menos activos, metabólicamente hablando, en la planta y la actividad del ciclo vegetativo y reproductor va aumentando con el paso de los meses hasta que llega al máximo de actividad en los meses de otoño. Además, como defensa frente a la radiación UV sufrida durante el verano, meses de mayor insolación, se van acumulando compuestos fenólicos lo que contribuiría al mayor contenido fenólico en el otoño.

Puesto que no se obtuvieron resultados favorables en la optimización de los extractos y su composición no fue reproducible con el extracto de origen se decidió continuar el presente trabajo con la combinación de flavonas responsables de la actividad antiproliferativa, diosmetina, apigenina y luteolina, en el ratio de proporción presente en el extracto de origen<sup>132</sup>, 5:1:1.

## 5.2. La mezcla de flavonas DAL511 presenta un efecto antiproliferativo en modelos celulares de cáncer de mama

Para determinar la capacidad antiproliferativa de la mezcla DAL511 en los modelos celulares de cáncer de mama se determinó en primer lugar la viabilidad celular mediante el conteo de núcleos con marcaje fluorescente del ADN y en paralelo en los modelos celulares MCF10A y THV como modelo de tejido sano para determinar el índice terapéutico.

Los resultados mostraron un efecto antiproliferativo provocado por el tratamiento con DAL511 en todos los modelos celulares de cáncer de mama utilizados, siendo este efecto más pronunciado si se compara con el efecto de la mezcla en un modelo celular de tejido no tumoral, MCF10A en el caso de los tumores primarios y THV en el caso de los tumores secundarios, por lo que se puede considerar un tratamiento con especificidad para las células tumorales.

La excepción es la línea celular JIMT-1, en donde el índice terapéutico no es seguro, es decir, que los efectos secundarios o sobre el tejido sano son demasiado altos, la mezcla presentó índices terapéuticos estrechos, lo que dentro de los tratamientos antitumorales es común ya que se buscan efectos citostáticos y citotóxicos que normalmente no afectan solo a los tumores sino también al resto de tejidos y por ello conllevan efectos secundarios<sup>152,153</sup>.

Estos resultados plantean el uso de DAL511 como posible tratamiento para el cáncer de mama en sus diferentes variantes, bien solo o en combinación con fármacos actuales, ya que los compuestos por separado o formando parte de un extracto vegetal han demostrado efectos similares como la apigenina en líneas celulares de cáncer de ovario (OVCAR-3) con una  $IC_{50}$  de  $75 \mu M^{154}$ , colon (HT-29) con una  $IC_{50}$  de  $30 \mu M^{155}$  o mama (MDA-MB-231) con una  $IC_{50}$  de  $40 \mu M^{156}$ , la luteolina en líneas celulares de cáncer de colon (HT-29) con una  $IC_{50}$  de  $90 \mu M^{157}$ , próstata (PC-3) con una  $IC_{50}$  de  $25 \mu M^{158}$  o mama (AU565) con una  $IC_{50}$  de  $40 \mu M^{159,160}$  y la diosmetina en líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2) con una  $IC_{50}$  de  $20 \mu g/ml^{161}$ , leucemia mieloide aguda (K562) con una  $IC_{50}$  de  $7 \mu M^{162}$  o cáncer de mama (MDA-MB-231) con una  $IC_{50}$  de  $25 \mu M^{163}$ . También existen ejemplos de su efecto en combinación con fármacos de uso en clínica como la doxorubicina en líneas celulares de hepatocarcinoma<sup>164</sup> o el 5-fluorouracilo en líneas celulares de cáncer de colon<sup>165</sup>. El uso combinado de fármacos permite obtener mejores resultados con dosis más bajas y, por tanto, con menores efectos adversos, que en el caso de los tratamientos oncológicos suelen ser frecuentes.

En el caso de los tumores HER2+ donde el IT es no seguro, habría que considerar su uso con fórmulas vehiculizadas para dirigir el tratamiento al tejido tumoral únicamente.

Sobre estas estrategias existen numerosos estudios que se basan en el uso de nanoformulaciones<sup>166</sup> con nanoliposomas<sup>167-172</sup> o nanopartículas<sup>173-176</sup> por ejemplo, y que incluso incluyen estrategias para aumentar su especificidad mediante su conjugación con anticuerpos frente a HER2<sup>177,178</sup> que han sido puestas a punto por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo.



El proceso de metástasis, como se ha explicado con anterioridad, es un proceso complejo y los estudios en modelos celulares presentan importantes limitaciones comparados con los ensayos *in vivo*, por ello, en estos modelos se estudian varios parámetros o capacidades de las células tumorales relacionadas con la capacidad metastásica. Estos parámetros incluyen la capacidad para la migración, invasión y supervivencia en la formación de tumores secundarios. Al mismo tiempo, los modelos celulares permiten ensayar un número mayor de compuestos, mezclas y condiciones necesarias para el desarrollo de un antitumoral.

En el presente trabajo, todas las líneas celulares utilizadas presentaron relevantes índices de cada uno de estos parámetros, que son inhibidos en mayor o menor medida, y dependiendo de la línea celular, por la mezcla DAL.

Como modelo de aproximación al estudio de la supervivencia en la formación de tumores secundarios, en este trabajo se estudió el efecto de la mezcla DAL511 sobre la capacidad de formación de colonias, el cual es uno de los métodos más comúnmente empleados para determinar esta supervivencia en modelos celulares. Este ensayo consiste en analizar la supervivencia celular a partir de la capacidad que tiene la célula de regenerarse tras haber sido expuesta a un agente tóxico, de manera que el comportamiento de las células *in vitro* nos permite estimar la posible respuesta a nivel *in vivo*<sup>179-181</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que la mezcla DAL511 produce una inhibición tanto en el número de colonias formadas como en el diámetro de las mismas en todos los modelos celulares de cáncer de mama utilizados, poniendo de manifiesto una reducción de la capacidad de supervivencia y, consecuentemente, del potencial de generación de tumores secundarios.

Por otro lado, pero relacionado también con la capacidad de supervivencia de las células tumorales, la migración y la invasión son características imprescindibles que poseen estas células para desarrollar metástasis. En la presente tesis doctoral se ha empleado el ensayo de herida o wound healing para estudiar ambas capacidades.

Este ensayo ha sido ampliamente validado como modelo para evaluar el efecto de los fármacos sobre estas características<sup>182</sup> y permite un seguimiento temporal de ambos procesos.

Los resultados mostraron una inhibición tanto de la migración como de la invasión (**Figura 99**) en todas las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas, llegando a inhibirlas casi por completo en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 ya que de por sí este subtipo de cáncer no posee elevadas capacidades migratorias e invasivas.

Al igual que con la capacidad antiproliferativa existen estudios previos donde ya se observaron estos efectos de los compuestos por separado o formando parte de un extracto vegetal por ejemplo de la apigenina inhibiendo en un 80% la capacidad de formar colonias en cáncer de mama (MDA-MB-231) a 10  $\mu\text{M}$ <sup>183</sup>, de la apigenina y la luteolina inhibiendo la capacidad de invasión en un 25% y 30% respectivamente en cáncer de ovario (OVCAR-3)<sup>154</sup>, de la luteolina inhibiendo la capacidad de migración e invasión entorno al 70% para ambos casos en cáncer de colon (SW480)<sup>157</sup> y de la diosmetina inhibiendo un 40% de la invasión en hepatocarcinoma (SK-HEP-1) a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>184</sup>. En todos los casos, los resultados vienen a confirmar lo encontrado en esta tesis doctoral, rondando porcentajes de inhibición similares en todos los casos, si bien, es necesario destacar que no se tratan de los mismos modelos celulares.

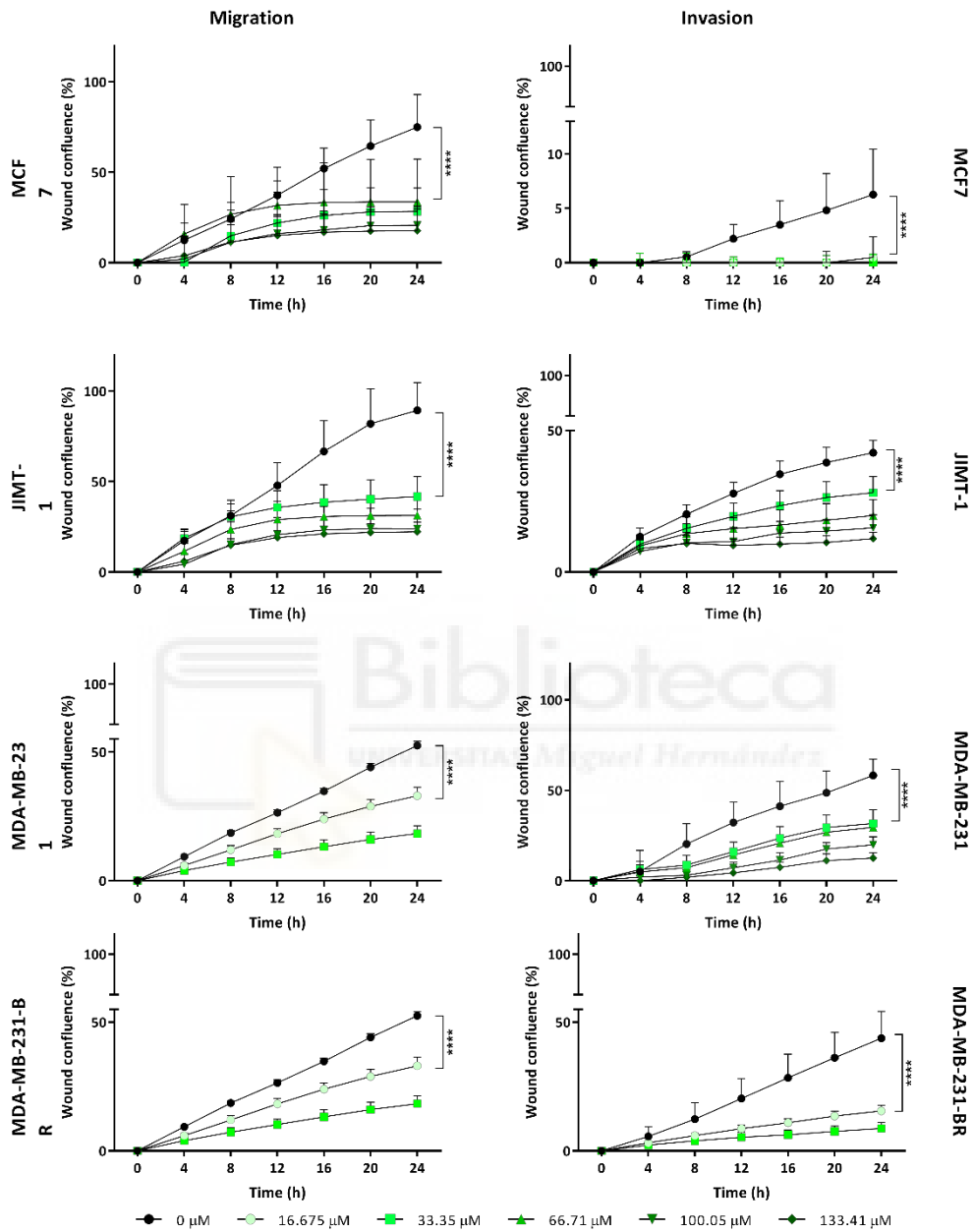


Figura 99. Resultados de los ensayos de migración e invasión para todos los modelos celulares

### 5.3. La mezcla de flavonas DAL511 tiene efectos citotóxicos y/o citostáticos en todos los modelos celulares utilizados.

En el presente trabajo se ha determinado cual es el mecanismo de muerte por el cual la mezcla DAL511 ejerce un efecto antiproliferativo sobre los diferentes modelos celulares de cáncer de mama y se llevó a cabo estudiando el efecto sobre las fases del ciclo celular, la apoptosis, el potencial de membrana y la generación de ROS.

Los resultados para el ciclo celular mostraron para todas las líneas celulares efectos citostáticos leves y un efecto citotóxico con un aumento significativo en la fase subG1 que sugiere apoptosis, excepto para la línea celular de cáncer de mama HER2+, JIMT-1, donde se observó que la acción predominante era un claro efecto citostático con bloqueo en las fases G2/M acompañada de un efecto citotóxico con aumento leve de la fase subG1.

Diversos autores han demostrado previamente el carácter citostático de estos compuestos por separado, por ejemplo la apigenina provoca bloqueo del ciclo celular en la fase S a 20  $\mu\text{M}$  en líneas celulares de cáncer de ovario (OCVAR-3 y SKOV-3)<sup>154</sup> o un bloqueo en la fase G2/M a 40  $\mu\text{M}$  mama(MDA-MB-231)<sup>156</sup>, la luteolina provoca un bloqueo de la fase G1 en una línea celular de cáncer de próstata (PC-3) a 20  $\mu\text{M}$ <sup>185</sup> o bloqueo en la fase S a 10  $\mu\text{M}$  en mama (MDA-MB-231)<sup>186</sup>, o la diosmetina provoca bloqueo en la fase S en cáncer de próstata (PC-3) a 20  $\mu\text{M}$ <sup>187</sup> o un bloqueo en la fase G1 a 50  $\mu\text{M}$  en mama (MDA-MB-231)<sup>163</sup>. En todos los casos, el rango de concentraciones es similar a los manejados en el presente trabajo.

Los resultados de la Anexina-V confirman el efecto citotóxico por apoptosis como mecanismo de muerte principal en las líneas de cáncer de mama en luminal MCF7 y triple negativo MDA-MB-231 y MDA-MB-231-BR con resultados positivos para la población Anexina-V/7-AAD +/- (apoptosis temprana) y Anexina-V/7-AAD +/- (apoptosis tardía) a las 24 horas, excepto en el caso de MCF7 donde la población Anexina-V/7-AAD +/- solo se observa en las primeras horas de tratamiento.

En el caso de la línea celular de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 se observa un aumento leve en ambas poblaciones correspondiente a una citotoxicidad como mecanismo de muerte celular ya que el mayor efecto es citostático.

También existen resultados previos donde estos compuestos por separado mostraron inducir la apoptosis en diferentes modelos tumorales, por ejemplo la apigenina en líneas celulares de colon (HT-29) a  $15 \mu\text{M}^{155}$ , de leucemia mieloide aguda (K562) a  $140 \mu\text{M}^{188}$ , de ovario (OCVAR-3 y SKOV-3) a  $20 \mu\text{M}^{154}$  o de mama (MDA-MB-453, BT-474 y SKBr-3) en un rango de  $10\text{-}20 \mu\text{M}^{183,189}$ , de luteolina en líneas celulares de glioblastoma (U87 y U-251 MG) a  $40 \mu\text{M}^{190}$ , hígado (SK-HEP-1, Huh y Hep3B) en un rango de  $20\text{-}40 \mu\text{M}^{191,192}$  o mama (MDA-MB-231) a  $10 \mu\text{M}^{186}$  y diosmetina en una línea celular de cáncer de hígado (HepG2) a  $10 \mu\text{M}^{193,194}$ , leucemia mieloide aguda (HL-60) a  $50 \mu\text{M}^{162,195}$  o mama (MDA-MB-231) a  $10 \mu\text{M}^{163}$ . De nuevo, el rango de concentraciones es similar a los manejados en el presente trabajo.

Para estudiar el efecto de la mezcla DAL511 sobre la mitocondria, se estudió el potencial de membrana midiendo el número de células con despolarización mitocondrial por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. La mitocondria está altamente relacionada con los procesos apoptóticos ya que la vía intrínseca de activación de la apoptosis, también conocida como vía mitocondrial, implica proteínas localizadas en la mitocondria como Bcl-2, Bak o el citocromo C y cursa con la despolarización de la membrana mitocondrial.

Además, se estudió también la generación de ROS con la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA ya que un aumento de ROS podría ser la causa del daño mitocondrial y por tanto del efecto citotóxico, así como bien podría ser una consecuencia de la disfunción mitocondrial ocasionada por la apoptosis.

Los resultados mostraron que para ambos ensayos la mezcla DAL511 provoca un aumento de la población celular con despolarización mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas, así como un aumento en la generación de ROS en las líneas de cáncer de mama luminal MCF7 y de cáncer de mama TNBC MDA-MB-23 y MDA-MB-231-BR mientras que en la línea de cáncer de mama HER2+ JIMT-1 no se observa, relacionándose así el aumento de ROS con el efecto citotóxico ya que es en esta línea donde predomina el efecto citostático frente al citotóxico.

Como con el resto de resultados los compuestos por separado ya habían mostrado comportamientos similares, por ejemplo la apigenina en líneas celulares de cáncer de ovario (SKOV-3) a 10  $\mu\text{M}$ <sup>196</sup> o melanoma (A375) a 30  $\mu\text{g/mL}$ <sup>197</sup>, la luteolina en líneas de cáncer de la vías biliares (KKU-100) a 25  $\mu\text{M}$ <sup>198</sup> o la diosmetina en líneas de cáncer de pulmón (A549) a 5  $\mu\text{M}$ <sup>199</sup> o mama (MDA-MB-231) a 10  $\mu\text{M}$ <sup>163</sup>. Al igual que en ocasiones anteriores, el rango de concentraciones es similar a los manejados en el presente trabajo.

Si se comparan los resultados publicados anteriormente en la bibliografía con los obtenidos para la mezcla, se observa como la combinación consigue que las concentraciones de los compuestos sean inferiores a las enumeradas en la bibliografía mejorando su efectividad al utilizarse en combinación.

Estos resultados sugieren que la mezcla DAL511 induce la apoptosis por su vía intrínseca o mitocondrial, aunque para corroborar esta hipótesis sería necesario estudiar el efecto de DAL511 sobre la expresión de las proteínas relacionadas con esta vía como son Bcl-2, Bak, Bax y las caspasas 3, 7 y 9.

Además se observa un efecto diferencial entre los diferentes modelos celulares utilizados lo que sugiere que los compuestos están actuando sobre diversas dianas moleculares ya que en cada subtipo molecular están desregulados diferentes mecanismos y rutas de señalización. Algunas de esas dianas podrían ser por ejemplo las rutas de señalización de MAPK<sup>200</sup> y PI3K<sup>155</sup> o algunos complejos ciclina-CDK<sup>201</sup> sobre las que ya se conoce el efecto de la diosmetina, la apigenina y la luteolina por separado.

## 5.4. Absorción intestinal y paso a través de la BHE

El modelo celular Caco-2 ha sido ampliamente utilizado para estudiar la absorción intestinal de compuestos bioactivos<sup>151,202-204</sup>. Este ensayo permite obtener los valores de permeabilidad aparente de los compuestos a estudio, permitiendo conocer el grado de absorción así como el posible mecanismo de transporte de los compuestos.

Los compuestos que poseen una elevada permeabilidad presentan valores de permeabilidad superiores a  $1 \times 10^{-5}$  cm/s, aquellos que tienen una permeabilidad moderada presentan valores entre  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$  cm/s, mientras que los compuestos que presentan una baja absorción presentan valores inferiores  $1 \times 10^{-7}$  cm/s<sup>147,205</sup>. Los resultados en este trabajo muestran que los tres compuestos en combinación son absorbidos en mayor o menor medida de manera moderada, siendo el que presenta mejor absorción la apigenina, seguido de la diosmetina y por último la luteolina.

En cuanto al tipo de transporte principal, los tres entran dentro del rango de Er para difusión pasiva, pero con ciertos matices. Por un lado, los valores obtenidos para la diosmetina y la apigenina están más cercanos a 2, valores que indicarían la posibilidad de que exista algún mecanismo de eflujo. Por otro lado, el valor de Er para la luteolina está más cercano a 0,5, pudiendo indicar un posible transporte activo en menor medida que la difusión.

Existen estudios previos donde se evaluó la permeabilidad en modelos celulares Caco-2 de los compuestos por separado y los valores de  $P_{app}$  son similares, aunque un poco superiores a los calculados en este trabajo donde se ha estudiado la absorción de los tres compuestos en combinación para observar posibles interacciones entre ellos<sup>150,206</sup>.

El hecho de que los valores de permeabilidad de los compuestos sean inferiores cuando son administrados conjuntamente puede deberse a distintos factores. Estos factores incluyen que exista un efecto en el balance de concentraciones entre ellos que afecte su absorción, así como a que empeore su solubilidad, ya que cuando se ha calculado la permeabilidad para estos compuestos utilizando extractos complejos que los contienen en algunos casos se han obtenido resultados inferiores a los obtenidos con los compuestos en solitario<sup>204</sup>. También puede deberse a que afecte al cálculo de permeabilidades el hecho de que la diosmetina puede ser metabolizada en luteolina por el citocromo p450 presente en las células de la monocapa Caco-2<sup>207-210</sup> variando las concentraciones de cada compuesto determinadas.

Por otro lado, es posible que la permeabilidad moderada de estos compuestos se deba a su baja solubilidad dado su carácter apolar, por ello algunas estrategias que producirían un aumento de la permeabilidad de los compuestos son el uso de formulaciones que mejoren su solubilidad como la encapsulación en liposomas<sup>211</sup>. Por otro lado, dado que los valores de  $E_r$  son muy cercanos al límite de secreción activa, tanto para la apigenina como para la diosmetina, otra estrategia para mejorar su permeabilidad sería el uso de inhibidores de las bombas de eflujo<sup>206,212</sup>.

Como se ha mencionado en el apartado de la introducción, existe una buena correlación entre los valores de  $P_{active}$ , derivados de la  $P_{app}$  obtenida en el modelo Caco-2, con los valores de permeabilidad *in situ* hematoencefálica (logPS), siempre que los compuestos no presenten eflujo ( $E_r < 2$ ).



Por tanto, los compuestos que presenten valores de  $P_{\text{active}} < 5 \times 10^{-6}$  cm/s se considerarán buenos candidatos para atravesar la barrera hematoencefálica<sup>213</sup>.

En cuanto a los datos obtenidos para la permeabilidad hematoencefálica, los resultados mostraron que los tres compuestos tienen potencial para ser candidatos para cruzar la BHE con valores inferiores a  $5 \times 10^{-6}$  cm/s.

Existen estudios *in vivo* donde tras el tratamiento, con los compuestos puros o con formulaciones o extractos que los contenían, se ha podido detectar, en tejido cerebral de rata, apigenina y metabolitos de diosmetina tras el tratamiento con una formulación a base de compuestos fenólicos<sup>214</sup>, apigenina a 0,82 µg/g en tejido cerebral de rata tras el tratamiento con el compuesto conjugado con L-lisina y luteolina a 800 ng/mL en sangre y tejido cerebral tras 4 semanas de tratamiento con el compuesto puro por vía oral<sup>215</sup>.

Dada la relevancia de las metástasis cerebrales, el hecho de que estos compuestos tengan una buena absorción a través de la BHE abre la puerta a futuros estudios *in vivo* que permitan valorar si la acción que presentan *in vitro* en el presente trabajo es también observable en modelos animales de metástasis cerebral.

Además, es necesario realizar ensayos *in vivo* para confirmar la absorción de estos compuestos tanto a nivel intestinal como de la BHE, ya que de esta manera se confirmarían los resultados *in vitro* y además se podría estudiar cómo es metabolizada la mezcla DAL511 a nivel intestinal y hepático, pudiendo estudiar el paso de la BHE por los diferentes metabolitos que se puedan producir tras las transformaciones de las enzimas de fase I y II, ya que estas transformaciones podrían afectar a su actividad antiproliferativa tanto a nivel de los tumores primarios como de las metástasis.

## 5.5. Aditividad, sinergia y antagonismo en la capacidad antiproliferativa de mezclas con diosmetina, apigenina y luteolina

El estudio de la sinergia como aproximación farmacológica es de gran relevancia dentro del campo de desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces. La sinergia entre compuestos permite reducir la dosis a administrar sin rebajar los efectos y disminuyendo por tanto los posibles efectos secundarios. Algunos ejemplos de ello son la sinergia observada entre los compuestos de un extracto de *Cistus salviifolius* en su actividad antimicrobiana<sup>121</sup> o el efecto sinérgico entre los compuestos de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* en su efecto inhibitorio de la acumulación de triglicéridos en adipocitos<sup>216</sup>.

Existen diferentes métodos para evaluar la presencia de sinergia entre compuestos y en este trabajo se han utilizado dos aproximaciones diferentes, una clásica como es el cálculo del FICI y la representación de isobogramas, y otra más actual con el software específico Compusyn. Hay que mencionar que los métodos del cálculo de FICI y la representación de isobogramas son métodos tradicionales y simplificados frente al software Compusyn que es un programa especializado en la búsqueda de efectos sinérgicos entre compuestos. Este software realiza el cálculo del tipo de interacción de forma más específica y precisa puesto que es un programa especialmente diseñado con este fin con una aproximación matemática más completa y adecuada, por lo que se explican las diferencias entre los resultados de aditividad e incluso antagonismo observados en los valores FICI que se corresponden a sinergia en los valores CI.

En este trabajo, el método de los isobogramas para las combinaciones dobles no ha proporcionado unos gráficos suficientemente detallados que permitan la trazada de curvas debido al carácter dependiente de la ratio de las interacciones, por lo que no ha resultado útil en este caso, si bien se puede comprobar que las tendencias observadas con los métodos matemáticos (cálculo de FICI y software Compusyn) se confirman también en los gráficos.

Pese a estas discrepancias entre los diferentes métodos, que se ven justificadas por las diferencias inherentes a los mismos, los resultados obtenidos son concordantes y comparables entre sí de forma mayoritaria y permiten confirmar la validez de estos.

Los resultados muestran que en ambas líneas celulares utilizadas, MCF7 y JIMT-1, la interacción es dependiente de la ratio, dándose tanto sinergia como antagonismo. Esto puede deberse a que el efecto antiproliferativo se produzca por la acción sobre diferentes dianas que actúan en combinación, lo que explicaría los efectos sinérgicos, y que según el ratio de activación que presenten, puedan anularse entre sí mediante sistemas de regulación de retroalimentación positiva, explicando así los efectos antagónicos. La existencia de fenómenos de competición por una misma diana molecular también explicaría estos resultados.

En el caso de la combinación triple, se observa una tendencia mayoritaria de antagonismo, pero si se observan las concentraciones de  $IC_{50}$  se ve una reducción de las concentraciones que aporta cada compuesto en muchos casos. El hecho de que, pese a esta reducción, el software Compusyn y el valor de FICI den como resultado antagonismo puede deberse a que, las concentraciones de  $IC_{50}$  son muy altas puesto que se suman las concentraciones aportadas por tres compuestos, y aunque son menores que la suma de los compuestos por separado la disminución no es suficiente como para considerarse sinergia.

Además, los fenómenos de retroalimentación y/o competición nombrados en el anterior párrafo para las mezclas binarias, también pueden explicar estos resultados para la mezcla triple.

En el caso de la ratio 5:1:1, de interés por ser el presente en el extracto de hoja de olivo de origen, se observa una reducción de la concentración de apigenina y luteolina, pero un leve aumento en la concentración de diosmetina, pero al ser este el compuesto mayoritario fuerza el resultado de antagonismo. Para futuros estudios con dichos compuestos sería conveniente seleccionar las ratios que presentaron sinergia, 6:4:1 siendo el único en el caso de la línea celular MCF7, o 4:2:1 y 3:1:3 siendo los mejores ratios con sinergia para la línea celular JIMT-1.

Existen numerosos estudios que demuestran el efecto sinérgico entre polifenoles, algunos de ellos, recogidos en el trabajo de revisión sobre sinergia, compuestos naturales y cáncer realizada por nuestro grupo y en el que se ha participado como coautora<sup>94</sup>.

Por ejemplo, una combinación de varios extractos vegetales mostró sinergia en su actividad protectora de la mucosa gástrica<sup>128</sup>, la combinación de apigenina con curcumina en su actividad antiproliferativa en modelos celulares de pulmón<sup>137</sup> o con hidroxigenkwanina en su actividad antiproliferativa en modelos celulares de glioma<sup>138</sup>.

Entre los compuestos estudiados en este trabajo existe un trabajo publicado sobre la combinación de luteolina y diosmetina en su actividad antiproliferativa en un modelo celular de cáncer de hígado donde se estudió mediante el método de la representación gráfica del isoblograma la sinergia entre ambos compuestos a una ratio de 1:1 dando como resultado un efecto sinérgico<sup>210</sup>. Pese a que se ha demostrado el carácter dependiente de la ratio de estas combinaciones y las diferencias entre modelos celulares para la ratio 1:1 también se han obtenido resultados sinérgicos en el presente trabajo para ambos modelos celulares estudiados.

También existen numerosos estudios que demuestran la sinergia de los polifenoles con otros fármacos, por ejemplo la diosmetina mostró sinergia con la eritromicina en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* multirresistente a antibióticos<sup>217</sup>, la curcumina<sup>218</sup> o los polifenoles del té<sup>219</sup> en combinación con inhibidores de la deacetilasa de histonas aumentan su capacidad antitumoral. Existen diversos estudios también que evidencian la sinergia entre polifenoles y fármacos antitumorales de uso en clínica actualmente, por ejemplo la apigenina en combinación con doxorubicina<sup>139,164</sup>, paclitaxel<sup>196</sup> o 5-fluorouracilo<sup>165</sup>, la luteolina con cisplatino<sup>220</sup> o doxorubicina<sup>176</sup> o las catequinas del té con la terapia antihormonal antiestrogénica<sup>221</sup>.

Todos estos resultados abren la puerta a futuros estudios en los que estos compuestos, solos o en combinación, sean probados en estudios combinados con los principales fármacos antitumorales usados en cáncer de mama. Además, como se han enumerado en la introducción, estos compuestos actúan sobre dianas específicas usadas en la terapia dirigida por lo que se reitera la hipótesis de que son buenos candidatos para utilizar en combinación con dichas terapias.

Finalmente se concluyó que la obtención de un extracto vegetal enriquecido no es la vía más adecuada para obtener un fármaco destinado a la terapia antitumoral, debido a la complejidad de obtener la cantidad suficiente de una mezcla con una composición estable y reproducible. Por esto, es una mejor opción el uso de combinaciones de compuestos puros basándose en las proporciones presentes en extractos con una buena actividad antiproliferativa o bien en estudios de sinergia.

En el presente trabajo se seleccionó primero la proporción presente en el extracto de origen (diosmetina, apigenina y luteolina, 5:1:1) y una vez determinado el efecto de la mezcla DAL511 se realizó el estudio sinérgico buscando otras proporciones que permitieran mejorar el efecto sobre los diferentes modelos celulares.

La mezcla DAL511 ha demostrado tener potencial para su uso como agente citotóxico/citostático en los principales tipos de cáncer de mama en combinación con otros fármacos antitumorales y que, además, teóricamente estos compuestos tendrían la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica permitiendo el tratamiento de las metástasis cerebrales, incurables en la actualidad.

Para continuar con el desarrollo de la mezcla triple, y teniendo en cuenta que los resultados de sinergia han arrojado que existen otras combinaciones mejores, se debería plantear estudiar la actividad de la combinación en las mejores ratios obtenidas como primera aproximación.

Posteriormente, sería recomendable realizar ensayos en modelos animales para determinar la toxicidad oral aguda, puesto que la vía de administración recomendable sería la oral al haber demostrado la mezcla la capacidad de ser absorbida a nivel intestinal. La formulación para administrar oralmente sería la misma que para los tratamiento celulares salvo por el DMSO, quedando el vehículo como PBS:PEG400:Tween80 (50:40:10) al igual que se utilizó en un estudio con extracto de romero realizado en el grupo de investigación en el que se ha realizado la tesis<sup>146</sup>. Después serían necesarios ensayos en modelos animales con xenotrasplantes para corroborar los efectos observados en los ensayos celulares y estudiar las posibles combinaciones con otros fármacos.



Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 6. Conclusiones





1. El método de obtención del extracto de hoja de olivo no presenta una reproducibilidad suficientemente consistente en cuanto a su composición y, por tanto, en su actividad biológica. Por ello es recomendable trabajar con combinaciones o mezclas de los compuestos puros responsables de su actividad biológica, diosmetina, apigenina y luteolina.
2. La principal causa de inhibición de la proliferación de la mezcla de flavonas DAL511 en los modelos celulares de cáncer de mama luminal (MCF7), TNBC (MDA-MB-231) y TNBC metastásico de cerebro (MDA-MB-231-BR) es la muerte celular por apoptosis (efecto citotóxico) con despolarización de la membrana mitocondrial y aumento de la generación de ROS, observándose también un efecto de bloqueo sobre el ciclo celular en la fase S (efecto citostático). Además, la mezcla DAL511 posee un índice terapéutico estrecho para los tres modelos.
3. En el modelo celular de cáncer de mama HER2+ (JIMT-1), la principal causa de inhibición de la proliferación por parte de la mezcla de flavonas DAL511 es un efecto de bloqueo sobre el ciclo celular en G2/M (efecto citostático), observándose también en menor medida muerte celular por apoptosis (efecto citotóxico) con leve despolarización de la membrana mitocondrial. La mezcla DAL511 posee un índice terapéutico no seguro para este modelo haciendo necesaria su vehiculización dirigida.
4. La mezcla de flavonas DAL511 muestra capacidad de inhibir la formación de colonias, la migración y la invasión en los cuatro modelos celulares llegando a inhibir la invasión por completo en el modelo menos agresivo, MCF7, y a su vez los diferentes modelos celulares presentan diferencias en la capacidad de migración e invasión observándose una pérdida de dichas capacidades en el modelo de tumor secundario TNBC, MDA-MB-231-BR frente al modelo de tumor primario TNBC, MDA-MB-231.



5. Los compuestos diosmetina, apigenina y luteolina, formando parte de la combinación DAL511, muestran una permeabilidad intestinal moderada y su principal tipo de transporte es la difusión pasiva en un modelo de monocapas celulares de Caco-2.
6. Los compuestos diosmetina, apigenina y luteolina muestran, mediante la utilización de un modelo matemático, ser buenos candidatos para atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su acción en el cerebro.
7. Los compuestos diosmetina, apigenina y luteolina muestran tanto para sus combinaciones dobles como para la combinación triple una tendencia dependiente de la ratio en sus interacciones sinérgicas presentando tanto sinergia como aditividad y antagonismo, en ambos modelos celulares, según el ratio en que se encuentren los compuestos.
8. La búsqueda de una mejora en la composición de la mezcla de flavonas diosmetina, apigenina y luteolina muestra que existen ratios, como son 6:4:1 y 4:2:1, que permiten aumentar la eficacia de la capacidad antiproliferativa de la mezcla mediante interacciones sinérgicas.



1. The method of obtaining the olive leaf extract does not have a sufficiently consistent reproducibility in terms of its composition and, therefore, in its biological activity. Therefore, it is advisable to work with combinations or mixtures of the pure compounds responsible for their biological activity, diosmetin, apigenin and luteolin.
2. The main cause of inhibition of proliferation of the DAL511 flavone mixture in luminal breast cancer (MCF7), TNBC (MDA-MB-231) and metastatic brain TNBC (MDA-MB-231-BR) cell models is apoptosis cell death (cytotoxic effect) with depolarization of the mitochondrial membrane and increased ROS generation, also observing a blocking effect on the cell cycle in the S phase (cytostatic effect). In addition, the DAL511 mixture has a narrow therapeutic index for all three models.
3. In the HER2+ breast cancer cell model (JIMT-1), the main cause of inhibition of proliferation by the flavone mixture DAL511 is a blocking effect on the cell cycle in G2/M (cytostatic effect), also observed to a lesser extent of cell death due to apoptosis (cytotoxic effect) with a level of mitochondrial membrane depolarization. The DAL511 mixture has an unsafe therapeutic index for this model, making it necessary to drive your vehicle.
4. The mixture of flavones DAL511 shows the ability to inhibit colony formation, migration and invasion in the four cell models, thus inhibiting the invasion completely in the less aggressive model, MCF7, and in turn the different cell models differences in Migration and invasion capacity, observing a loss of various capacities in the TNBC secondary tumor model, MDA-MB-231-BR versus the TNBC primary tumor model, MDA-MB-231.



5. The compounds diosmetin, apigenin and luteolin, forming part of the DAL511 combination, showing moderate intestinal permeability and its main type of transport is passive diffusion in a model of Caco-2 cell monolayers.
6. The compounds diosmetina, apigenina and luteolina determined, by means of the use of a mathematical model, to be good candidates to cross the blood-brain barrier and to exert their action in the brain.
7. The compounds diosmetin, apigenin and luteolin show both for their double combinations and for the triple combination a trend dependent on their synergistic interactions, presenting both synergy and additivity and antagonism, in both mobile models, according to the index in which they are found. the compounds
8. The search for an improvement in the composition of the mixture of flavones diosmetin, apigenin and luteolin shows that they exist, such as 6:4:1 and 4:2:1, which allow increasing the effectiveness of the antiproliferative capacity of the mixture through synergistic interactions.







Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 7. Bibliografía



- 1 Pan, M. H., Chiou, Y. S., Wang, Y. J., Ho, C. T. & Lin, J. K. Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. *Food & Function* **2**, 101-110, doi:10.1039/c0fo00174k (2011).
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 3 Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941-1953, doi:10.1002/ijc.31937 (2019).
- 4 Amin, M. B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edn, (Springer International Publishing, 2017).
- 5 Pike, M. C., Spicer, D. V., Dahmouch, L. & Press, M. F. Estrogens, progestogens, normal breast cell-proliferation, and breast-cancer risk. *Epidemiologic Reviews* **15**, 17-35, doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036102 (1993).
- 6 Kleibl, Z. & Kristensen, V. N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast* **28**, 136-144, doi:10.1016/j.breast.2016.05.006 (2016).
- 7 Fogli, S. *et al.* Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. *Nutrition and Cancer-an International Journal* **68**, 873-877, doi:10.1080/01635581.2016.1180407 (2016).
- 8 Rakha, E. A., Reis, J. S. & Ellis, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **120**, 293-308, doi:10.1007/s10549-010-0746-x (2010).
- 9 Sotiriou, C. & Pusztai, L. Molecular origins of cancer Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 790-800 (2009).
- 10 Alluri, P. G., Speers, C. & Chinnaiyan, A. M. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Research* **16**, doi:10.1186/s13058-014-0494-7 (2014).
- 11 Mc Cormack, O., Harrison, M., Kerin, M. J. & McCann, A. Role of the progesterone receptor (PR) and the PR isoforms in breast cancer. *Crit Rev Oncog* **13**, 283-301 (2007).
- 12 Dai, X. F. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research* **5**, 2929-2943 (2015).
- 13 Mitri, Z., Constantine, T. & O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy research and practice* **2012**, 743193, doi:10.1155/2012/743193 (2012).

- 14 Luporsi, E. *et al.* Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 895-915, doi:10.1007/s10549-011-1837-z (2012).
- 15 Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A. & Caldas, C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* **23**, 7350-7360, doi:10.1200/jco.2005.03.3845 (2005).
- 16 Parker, J. S. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160-1167, doi:10.1200/jco.2008.18.1370 (2009).
- 17 Lal, S., Reed, A. E. M., de Luca, X. M. & Simpson, P. T. Molecular signatures in breast cancer. *Methods* **131**, 135-146, doi:10.1016/j.ymeth.2017.06.032 (2017).
- 18 Fan, C. *et al.* Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 560-569, doi:10.1056/NEJMoa052933 (2006).
- 19 Voduc, K. D. *et al.* Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1684-1691, doi:10.1200/jco.2009.24.9284 (2010).
- 20 Howlader, N. *et al.* US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *Jnci-Journal of the National Cancer Institute* **106**, doi:10.1093/jnci/dju055 (2014).
- 21 Arvold, N. D. *et al.* Age, Breast Cancer Subtype Approximation, and Local Recurrence After Breast-Conserving Therapy. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3885-3891, doi:10.1200/jco.2011.36.1105 (2011).
- 22 Haque, R. *et al.* Impact of Breast Cancer Subtypes and Treatment on Survival: An Analysis Spanning Two Decades. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **21**, 1848-1855, doi:10.1158/1055-9965.epi-12-0474 (2012).
- 23 Metzger, O. *et al.* Patterns of Recurrence and Outcome According to Breast Cancer Subtypes in Lymph Node-Negative Disease: Results From International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3083+, doi:10.1200/jco.2012.46.1574 (2013).
- 24 Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869-10874, doi:10.1073/pnas.191367098 (2001).
- 25 Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70, doi:10.1038/nature11412 (2012).
- 26 Zong, Y. *et al.* Progesterone Receptor Status and Ki-67 Index May Predict Early Relapse in Luminal B/HER2 Negative Breast Cancer Patients: A Retrospective Study. *Plos One* **9**, doi:10.1371/journal.pone.0095629 (2014).
- 27 Samavat, H. & Kurzer, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* **356**, 231-243, doi:10.1016/j.canlet.2014.04.018 (2015).

- 28 Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F. & Wang, B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **16**, 335-343, doi:10.1016/j.clbc.2016.05.012 (2016).
- 29 Balduzzi, S. *et al.* Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, doi:10.1002/14651858.CD006242.pub2 (2014).
- 30 Atchley, D. P. *et al.* Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4282-4288, doi:10.1200/jco.2008.16.6231 (2008).
- 31 Toft, D. J. & Cryns, V. L. Minireview: Basal-Like Breast Cancer: From Molecular Profiles to Targeted Therapies. *Molecular Endocrinology* **25**, 199-211, doi:10.1210/me.2010-0164 (2011).
- 32 Badve, S. *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology* **24**, 157-167, doi:10.1038/modpathol.2010.200 (2011).
- 33 Nussbaum, E. S., Djalilian, H. R., Cho, K. H. & Hall, W. A. Brain metastases - Histology, multiplicity, surgery, and survival. *Cancer* **78**, 1781-1788, doi:10.1002/(sici)1097-0142(19961015)78:8<1781::aid-cnrc19>3.0.co;2-u (1996).
- 34 Cooper, J. B. *et al.* Molecular Sequence of Events and Signaling Pathways in Cerebral Metastases. *Anticancer Research* **38**, 1859-1877, doi:10.21873/anticanres.12424 (2018).
- 35 Lalatsa, A. & Butt, A. M. in *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors* (eds P. Kesharwani & U. Gupta) 49-74 (Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, 2018).
- 36 Fidler, I. J. The Biology of Brain Metastasis Challenges for Therapy. *Cancer Journal* **21**, 284-293, doi:10.1097/ppo.000000000000126 (2015).
- 37 Strilic, B. *et al.* Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* **536**, 215+, doi:10.1038/nature19076 (2016).
- 38 Bos, P. D. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **459**, 1005-U1137, doi:10.1038/nature08021 (2009).
- 39 Calabrese, C. *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**, 69-82, doi:10.1016/j.ccr.2006.11.020 (2007).
- 40 Holash, J. *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994-1998, doi:10.1126/science.284.5422.1994 (1999).
- 41 Valiente, M. *et al.* Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Co-Option in Brain Metastasis. *Cell* **156**, 1002-1016, doi:10.1016/j.cell.2014.01.040 (2014).

- 42 Bower, J. J. *et al.* Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *NPJ breast cancer* **3**, 9-9, doi:10.1038/s41523-017-0009-7 (2017).
- 43 Oikonomou, C. & Cross, F. R. Rising Cyclin-CDK Levels Order Cell Cycle Events. *Plos One* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0020788 (2011).
- 44 Duronio, R. J. & Xiong, Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, doi:10.1101/cshperspect.a008904 (2013).
- 45 Golstein, P. & Kroemer, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 37-43, doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001 (2007).
- 46 Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. & Samali, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International journal of cell biology* **2010**, 214074, doi:10.1155/2010/214074 (2010).
- 47 Zhao, H. *et al.* Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell death & disease* **6**, e1975, doi:10.1038/cddis.2015.316 (2015).
- 48 Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337 (2007).
- 49 Nagasaka, A., Kawane, K., Yoshida, H. & Nagata, S. Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell Death Differ.* **17**, 931-941, doi:10.1038/cdd.2009.186 (2010).
- 50 Burgess, D. J. APOPTOSIS Refined and lethal. *Nature Reviews Cancer* **13**, 79-79 (2013).
- 51 Gross, A. *et al.* Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X-L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1156-1163, doi:10.1074/jbc.274.2.1156 (1999).
- 52 Miyashita, T. *et al.* TUMOR-SUPPRESSOR P53 IS A REGULATOR OF BCL-2 AND BAX GENE-EXPRESSION IN-VITRO AND IN-VIVO. *Oncogene* **9**, 1799-1805 (1994).
- 53 Galluzzi, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *Embo Journal* **34**, 856-880, doi:10.15252/embj.201490784 (2015).
- 54 Villar, V. H., Merhi, F., Djavaheiri-Mergny, M. & Duran, R. V. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy* **11**, 1198-1208, doi:10.1080/15548627.2015.1053680 (2015).
- 55 Mah, L. Y. & Ryan, K. M. Autophagy and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a008821 (2012).
- 56 Yang, Y., Coleman, M., Zhang, L., Zheng, X. & Yue, Z. Autophagy in axonal and dendritic degeneration. *Trends Neurosci.* **36**, 418-428, doi:10.1016/j.tins.2013.04.001 (2013).

- 57 Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V. & Sierra, A. Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *International journal of molecular sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18030598 (2017).
- 58 Xilouri, M. & Stefanis, L. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Research Reviews* **32**, 13-21, doi:10.1016/j.arr.2016.07.001 (2016).
- 59 Chauhan, S., Mandell, M. A. & Deretic, V. IRGM Governs the Core Autophagy Machinery to Conduct Antimicrobial Defense. *Mol. Cell* **58**, 507-521, doi:10.1016/j.molcel.2015.03.020 (2015).
- 60 Chiu, H. C. *et al.* Eradication of intracellular *Francisella tularensis* in THP-1 human macrophages with a novel autophagy inducing agent. *Journal of Biomedical Science* **16**, doi:10.1186/1423-0127-16-110 (2009).
- 61 Hasima, N. & Ozpolat, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death & Disease* **5**, doi:10.1038/cddis.2014.467 (2014).
- 62 Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**, 961-967, doi:10.1038/nrc2254 (2007).
- 63 Khan, N., Afaq, F., Kweon, M.-H., Kim, K. & Mukhtar, H. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res.* **67**, 3475-3482, doi:10.1158/0008-5472.can-06-3941 (2007).
- 64 Handy, D. E. & Loscalzo, J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxidants & Redox Signaling* **16**, 1323-1367, doi:10.1089/ars.2011.4123 (2012).
- 65 Aon, M. A., Cortassa, S. & O'Rourke, B. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1797**, 865-877, doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.016 (2010).
- 66 Perez-Torres, I., Guarner-Lans, V. & Rubio-Ruiz, M. E. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18102098 (2017).
- 67 Mencialha, A., Victorino, V. J., Cecchini, R. & Panis, C. Mapping Oxidative Changes in Breast Cancer: Understanding the Basic to Reach the Clinics. *Anticancer Research* **34**, 1127-1140 (2014).
- 68 Jezierska-Drutel, A., Rosenzweig, S. A. & Neumann, C. A. Role of Oxidative Stress and the Microenvironment in Breast Cancer Development and Progression. *Advances in Cancer Research, Vol 119* **119**, 107-125, doi:10.1016/b978-0-12-407190-2.00003-4 (2013).
- 69 Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 931-947, doi:10.1038/nrd4002 (2013).
- 70 Hecht, F. *et al.* The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biology* **37**, 4281-4291, doi:10.1007/s13277-016-4873-9 (2016).

- 71 Kupsco, A. & Schlenk, D. Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 317 **317**, 1-66, doi:10.1016/bs.ircmb.2015.02.002 (2015).
- 72 Navarro-Yepes, J. *et al.* Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**, 66-85, doi:10.1089/ars.2014.5837 (2014).
- 73 Samoylenko, A. *et al.* Nutritional Countermeasures Targeting Reactive Oxygen Species in Cancer: From Mechanisms to Biomarkers and Clinical Evidence. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**, 2157-2196, doi:10.1089/ars.2012.4662 (2013).
- 74 Granata, S., Dalla Gassa, A., Tomei, P., Lupo, A. & Zaza, G. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Nutrition & Metabolism* **12**, doi:10.1186/s12986-015-0044-z (2015).
- 75 Szeto, H. H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents. *Aaps Journal* **8**, E521-E531, doi:10.1208/aapsj080362 (2006).
- 76 Bai, J. X. & Cederbaum, A. I. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biological Signals and Receptors* **10**, 189-199 (2001).
- 77 Losada-Echeberría, M., Herranz-López, M., Micol, V. & Barrajón-Catalán, E. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants* **6**, 88-111, doi:10.3390/antiox6040088 (2017).
- 78 Moseley, V. R., Morris, J., Knackstedt, R. W. & Wargovich, M. J. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin 3-Gallate, Contributes to the Degradation of DNMT3A and HDAC3 in HCT 116 Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Res.* **33**, 5325-5333 (2013).
- 79 Kang, I., Okla, M. & Chung, S. Ellagic acid inhibits adipocyte differentiation through coactivator-associated arginine methyltransferase 1-mediated chromatin modification. *Journal of Nutritional Biochemistry* **25**, 946-953, doi:10.1016/j.jnutbio.2014.04.008 (2014).
- 80 Fang, M., Chen, D. & Yang, C. S. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.* **137**, 223S-228S (2007).
- 81 Pathiraja, T. N., Stearns, V. & Oesterreich, S. Epigenetic Regulation in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer-Role in Treatment Response. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 35-47, doi:10.1007/s10911-010-9166-0 (2010).
- 82 Carpenter, R. L. & Lo, H.-W. Regulation of Apoptosis by HER2 in Breast Cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis* **2013** (2013).
- 83 Zhou, B. H. P. *et al.* HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology* **3**, 973-982, doi:10.1038/ncb1101-973 (2001).



- 84 Tao, L., Park, J. Y. & Lambert, J. D. Differential prooxidative effects of the green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in normal and oral cancer cells are related to differences in sirtuin 3 signaling. *Molecular Nutrition & Food Research* **59**, 203-211, doi:10.1002/mnfr.201400485 (2015).
- 85 Boekhout, A. H., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Trastuzumab. *Oncologist* **16**, 800-810, doi:10.1634/theoncologist.2010-0035 (2011).
- 86 Sidera, K., Gaitanou, M., Stellas, D., Matsas, R. & Patsavoudi, E. A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J. Biol. Chem.* **283**, 2031-2041, doi:10.1074/jbc.M701803200 (2008).
- 87 Citri, A. *et al.* Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* **281**, 14361-14369, doi:10.1074/jbc.M512613200 (2006).
- 88 Siddiq, A., Long, L. M., Li, L., Marciniak, R. A. & Kazhdan, I. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *Bmc Cancer* **8**, doi:10.1186/1471-2407-8-129 (2008).
- 89 Garcia-Carbonero, R., Carnero, A. & Paz-Ares, L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncology* **14**, E358-E369 (2013).
- 90 Menendez, J. A. & Lupu, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* **7**, 763-777, doi:10.1038/nrc2222 (2007).
- 91 Yoon, S. *et al.* Up-regulation of Acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 26122-26131, doi:10.1074/jbc.M702854200 (2007).
- 92 Pizer, E. S. *et al.* Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenograft. *Cancer Res.* **60**, 213-218 (2000).
- 93 Yan, Y.-y. *et al.* Blockade of Her2/neu Binding to Hsp90 by Emodin Azide Methyl Anthraquinone Derivative Induces Proteasomal Degradation of Her2/neu. *Molecular Pharmaceutics* **8**, 1687-1697, doi:10.1021/mp2000499 (2011).
- 94 Herranz-Lopez, M., Losada-Echeberria, M. & Barrajon-Catalan, E. The Multitarget Activity of Natural Extracts on Cancer: Synergy and Xenohormesis. *Medicines (Basel, Switzerland)* **6**, doi:10.3390/medicines6010006 (2018).
- 95 Laval, J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol. Biol. (Paris)*. **44**, 14-24 (1996).
- 96 Vinas, G., Puig, T. & Porta, R. Oxidative stress in patients with cancer: two sides of the same coin. *Med. Clin. (Barc)*. **139**, 171-175, doi:10.1016/j.medcli.2011.11.021 (2012).

- 97 Garcia-Villalba, R. *et al.* Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 416-429, doi:10.1016/j.jpba.2009.06.021 (2010).
- 98 Pereira, T. M. C. *et al.* Coadjuvants in the Diabetic Complications: Nutraceuticals and Drugs with Pleiotropic Effects. *International journal of molecular sciences* **17**, doi:10.3390/ijms17081273 (2016).
- 99 Gothai, S. *et al.* Natural Phyto-Bioactive Compounds for the Treatment of Type 2 Diabetes: Inflammation as a Target. *Nutrients* **8**, doi:10.3390/nu8080461 (2016).
- 100 Molino, S. *et al.* Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials. *Life Sci.* **161**, 69-77, doi:10.1016/j.lfs.2016.07.021 (2016).
- 101 Quinones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutricion Hospitalaria* **27**, 76-89, doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418 (2012).
- 102 Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J. & Yang, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 284S-291S (2005).
- 103 Kale, A. *et al.* A combination of green tea extract, specific nutrient mixture and quercetin: An effective intervention treatment for the regression of N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced mammary tumors in Wistar rats. *Oncology Letters* **1**, 313-317, doi:10.3892/ol\_00000056 (2010).
- 104 Venkatesan, T., Choi, Y. W., Mun, S. P. & Kim, Y. K. Pinus radiata bark extract induces caspase-independent apoptosis-like cell death in MCF-7 human breast cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* **32**, 451-464, doi:10.1007/s10565-016-9346-9 (2016).
- 105 Chang, C. H., Ou, T. T., Yang, M. Y., Huang, C. C. & Wang, C. J. Nelumbo nucifera Gaertn leaves extract inhibits the angiogenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulation connective tissue growth factor (CTGF) mediated PI3K/AKT/ERK signaling. *J. Ethnopharmacol.* **188**, 111-122, doi:10.1016/j.jep.2016.05.012 (2016).
- 106 Studzinska-Sroka, E., Piotrowska, H., Kucinska, M., Murias, M. & Bylka, W. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from Hypogymnia physodes against breast cancer cell lines. *Pharmaceutical Biology* **54**, 2480-2485, doi:10.3109/13880209.2016.1160936 (2016).
- 107 Sharma, K. *et al.* Anticancer Effects of Extracts from the Fruit of Morinda Citrifolia (Noni) in Breast Cancer Cell Lines. *Drug Research* **66**, 141-147, doi:10.1055/s-0035-1555804 (2016).
- 108 Muller, P. Y. & Milton, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 751-761, doi:10.1038/nrd3801 (2012).

- 109 Copple, I. M. *et al.* Chemical Tuning Enhances Both Potency Toward Nrf2 and In Vitro Therapeutic Index of Triterpenoids. *Toxicological Sciences* **140**, 462-469, doi:10.1093/toxsci/kfu080 (2014).
- 110 Tamargo, J., Le Heuzey, J. Y. & Mabo, P. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. *European Journal of Clinical Pharmacology* **71**, 549-567, doi:10.1007/s00228-015-1832-0 (2015).
- 111 Chen, M. L. *et al.* Bioavailability and bioequivalence: An FDA regulatory overview. *Pharmaceutical Research* **18**, 1645-1650, doi:10.1023/a:1013319408893 (2001).
- 112 Hu, B., Liu, X. X., Zhang, C. L. & Zeng, X. X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**, 3-15, doi:10.1016/j.jfda.2016.11.004 (2017).
- 113 Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**, 507-526, doi:10.1002/mnfr.200700326 (2008).
- 114 Fresco, P., Borges, F., Marques, M. P. M. & Diniz, C. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. *Current Pharmaceutical Design* **16**, 114-134, doi:10.2174/138161210789941856 (2010).
- 115 Gonzalez-Vallinas, M., Gonzalez-Castejon, M., Rodriguez-Casado, A. & de Molina, A. R. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews* **71**, 585-599, doi:10.1111/nure.12051 (2013).
- 116 Mojzer, E. B., Hrcic, M. K., Skerget, M., Knez, Z. & Bren, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**, 38, doi:10.3390/molecules21070901 (2016).
- 117 Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747 (2004).
- 118 Murota, K. & Terao, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **417**, 12-17, doi:10.1016/s0003-9861(03)00284-4 (2003).
- 119 Kawabata, K., Yoshioka, Y. & Terao, J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* **24**, 25, doi:10.3390/molecules24020370 (2019).
- 120 Spencer, J. P. E. *et al.* Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**, 236-241, doi:10.1006/bbrc.2000.2749 (2000).
- 121 Tomas-Menor, L. *et al.* The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics? *Phytotherapy Research* **29**, 466-473, doi:10.1002/ptr.5296 (2015).

- 122 Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative-analysis of dose-effect relationships - the combined effects of multiple-drugs or enzyme-inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* **22**, 27-55, doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4 (1984).
- 123 Chou, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **58**, 621-681 (2006).
- 124 Wagner, H. & Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **16**, 97-110, doi:10.1016/j.phymed.2008.12.018 (2009).
- 125 Grotto, M., Dikstein, S. & Sulman, F. G. ADDITIVE AND AUGMENTATIVE SYNERGISM BETWEEN ANALGESIC DRUGS. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie* **155**, 365-& (1965).
- 126 Melo, P. S., Rodrigues Arrivetti, L. d. O., de Alencar, S. M. & Skibsted, L. H. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with alpha-tocopherol of acai seed extracts and grape rachis extracts. *Food Chemistry* **213**, 440-449, doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.101 (2016).
- 127 Sakagami, H. *et al.* Synergism of Alkaline Extract of the Leaves of *Sasa senanensis* Rehder and Antiviral Agents. *In Vivo* **30**, 421-426 (2016).
- 128 Wang, C. H. *et al.* Synergy Effects of Three Plant Extracts on Protection of Gastric Mucosa. *Natural Product Communications* **10**, 1989-1991 (2015).
- 129 Hernaez, A. *et al.* Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *J. Nutr.* **145**, 1692-1697, doi:10.3945/jn.115.211557 (2015).
- 130 Menendez, J. A. *et al.* Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *Bmc Cancer* **8**, doi:10.1186/1471-2407-8-377 (2008).
- 131 Goldsmith, C. D. *et al.* Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells. *Molecules* **20**, 12992-13004, doi:10.3390/molecules200712992 (2015).
- 132 Barraji3n-Catal3n, E. *et al.* Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **105**, 156-162, doi:10.1016/j.jpba.2014.11.048 (2015).
- 133 Taamalli, A. *et al.* Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1817-1825, doi:10.1016/j.fct.2012.02.090 (2012).

- 134 Lockyer, S., Rowland, I., Spencer, J. P. E., Yaqoob, P. & Stonehouse, W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *European Journal of Nutrition* **56**, 1421-1432, doi:10.1007/s00394-016-1188-y (2017).
- 135 Wu, L. X., Xu, Y. Y., Yang, Z. J. & Feng, Q. Hydroxytyrosol and olive leaf extract exert cardioprotective effects by inhibiting GRP78 and CHOP expression. *Journal of Biomedical Research* **32**, 371-379, doi:10.7555/jbr.32.20170111 (2018).
- 136 Fakhraei, N. *et al.* Protective Effect of Hydroalcoholic Olive Leaf Extract on Experimental Model of Colitis in Rat: Involvement of Nitrergic and Opioidergic Systems. *Phytotherapy Research* **28**, 1367-1373, doi:10.1002/ptr.5139 (2014).
- 137 Choudhury, D. *et al.* Apigenin shows synergistic anticancer activity with curcumin by binding at different sites of tubulin. *Biochimie* **95**, 1297-1309, doi:10.1016/j.biochi.2013.02.010 (2013).
- 138 Wang, Y. *et al.* Synergistic anti-glioma effect of Hydroxygenkwanin and Apigenin in vitro. *Chemico-Biological Interactions* **206**, 346-355, doi:10.1016/j.cbi.2013.10.009 (2013).
- 139 Mahbub, A. A., Le Maitre, C. L., Haywood-Small, S. L., Cross, N. A. & Jordan-Mahy, N. Polyphenols act synergistically with doxorubicin and etoposide in leukaemia cell lines. *Cell Death Discovery* **1**, doi:10.1038/cddiscovery.2015.43 (2015).
- 140 Soule, H. D. *et al.* Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial-cell line, MCF-10. *Cancer Research* **50**, 6075-6086 (1990).
- 141 Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. HUMAN CELL LINE FROM A PLEURAL EFFUSION DERIVED FROM A BREAST CARCINOMA. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1409-1416, doi:10.1093/jnci/51.5.1409 (1973).
- 142 Tanner, M. *et al.* Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1585-1592 (2004).
- 143 Cailleau, R., Young, R., Olive, M. & Reeves, W. J. BREAST TUMOR-CELL LINES FROM PLEURAL EFFUSIONS. *Journal of the National Cancer Institute* **53**, 661-674, doi:10.1093/jnci/53.3.661 (1974).
- 144 Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M. & Nishimura, R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 1486-1495, doi:10.1359/jbmr.2001.16.8.1486 (2001).
- 145 Fogh, J., Wright, W. C. & Loveless, J. D. ABSENCE OF HELA-CELL CONTAMINATION IN 169 CELL LINES DERIVED FROM HUMAN TUMORS. *Journal of the National Cancer Institute* **58**, 209-214, doi:10.1093/jnci/58.2.209 (1977).

- 146 Perez-Sanchez, A. *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract causes ROS-induced necrotic cell death and inhibits tumor growth in vivo. *Scientific Reports* **9**, 11, doi:10.1038/s41598-018-37173-7 (2019).
- 147 Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 280-289, doi:10.1016/j.addr.2012.09.005 (2012).
- 148 Lin, H. X. *et al.* Enhancing effect of surfactants on fexofenadine center dot HCl transport across the human nasal epithelial cell monolayer. *International Journal of Pharmaceutics* **330**, 23-31, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.08.043 (2007).
- 149 Taamalli, A. *et al.* Monitoring the Bioactive Compounds Status in *Olea europaea* According to Collecting Period and Drying Conditions. *Energies* **12**, doi:10.3390/en12050947 (2019).
- 150 Tian, X. J., Yang, X. W., Yang, X. D. & Wang, K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics* **367**, 58-64, doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.023 (2009).
- 151 Wang, Q. *et al.* Permeability through the Caco-2 cell monolayer of 42 bioactive compounds in the TCM formula Gegen-Qinlian Decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **146**, 206-213, doi:10.1016/j.jpba.2017.08.042 (2017).
- 152 Decosterd, L. A. *et al.* Therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapy. *Biomarkers in Medicine* **9**, 887-893, doi:10.2217/bmm.15.78 (2015).
- 153 Kim, H. Y., Martin, J. H., McLachlan, A. J. & Boddy, A. V. Precision dosing of targeted anticancer drugs-challenges in the real world. *Translational Cancer Research* **6**, S1500-S1511, doi:10.21037/tcr.2017.10.30 (2017).
- 154 Tavsan, Z. & Kayali, H. A. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **116**, doi:10.1016/j.biopha.2019.109004 (2019).
- 155 Chen, X. P. *et al.* Apigenin inhibits in vitro and in vivo tumorigenesis in cisplatin-resistant colon cancer cells by inducing autophagy, programmed cell death and targeting m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *Journal of Buon* **24**, 488-493 (2019).
- 156 Tseng, T. H. *et al.* Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation and tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest and histone H3 acetylation-mediated p21(WAF1/CIP1) expression. *Environmental Toxicology* **32**, 434-444, doi:10.1002/tox.22247 (2017).
- 157 Yao, Y. Y., Rao, C. H., Zheng, G. & Wang, S. S. Luteolin suppresses colorectal cancer cell metastasis via regulation of the miR-384/pleiotrophin axis. *Oncology Reports* **42**, 131-141, doi:10.3892/or.2019.7136 (2019).

- 158 Atala, A. Re: Luteolin Attenuates Wnt Signaling via Upregulation of FZD6 to Suppress Prostate Cancer Stemness Revealed by Comparative Proteomics Editorial Comment. *Journal of Urology* **200**, 1168-1168 (2018).
- 159 Ahmed, S. *et al.* Apoptosis induced by luteolin in breast cancer: Mechanistic and therapeutic perspectives. *Phytomedicine* **59**, doi:10.1016/j.phymed.2019.152883 (2019).
- 160 Chiang, C.-T., Way, T.-D. & Lin, J.-K. Sensitizing HER2-overexpressing cancer cells to luteolin-induced apoptosis through suppressing p21(WAF1/CLP1) expression with rapamycin. *Molecular Cancer Therapeutics* **6**, 2127-2138, doi:10.1158/1535-7163.mct-07-0107 (2007).
- 161 Liu, B. *et al.* Diosmetin Induces Cell Apoptosis by Regulating CYP1A1/CYP1A2 Due to p53 Activation in HepG2 Cells. *Protein and Peptide Letters* **24**, 406-412, doi:10.2174/0929866524666170227123557 (2017).
- 162 Roma, A., Rota, S. G. & Spagnuolo, P. A. Diosmetin Induces Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Molecular Pharmaceutics* **15**, 1353-1360, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b01151 (2018).
- 163 Wang, C. J. *et al.* Anti-Proliferation and Pro-Apoptotic Effects of Diosmetin via Modulating Cell Cycle Arrest and Mitochondria-Mediated Intrinsic Apoptotic Pathway in MDA-MB-231 Cells. *Medical Science Monitor* **25**, 4639-4647, doi:10.12659/msm.914058 (2019).
- 164 Korga, A. *et al.* Apigenin and hesperidin augment the toxic effect of doxorubicin against HepG2 cells. *Bmc Pharmacology & Toxicology* **20**, doi:10.1186/s40360-019-0301-2 (2019).
- 165 Sen, K., Banerjee, S. & Mandal, M. Dual drug loaded liposome bearing apigenin and 5-Fluorouracil for synergistic therapeutic efficacy in colorectal cancer. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **180**, 9-22, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.035 (2019).
- 166 Davatgaran-Taghipour, Y. *et al.* Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 2689-2702, doi:10.2147/ijn.s131973 (2017).
- 167 Sinha, A. & Suresh, P. K. Enhanced Induction of Apoptosis in HaCaT Cells by Luteolin Encapsulated in PEGylated Liposomes Role of Caspase-3/Caspase-14. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **188**, 147-164, doi:10.1007/s12010-018-2907-z (2019).
- 168 Wu, G., Li, J., Yue, J., Zhang, S. & Yunusi, K. Liposome encapsulated luteolin showed enhanced antitumor efficacy to colorectal carcinoma. *Molecular Medicine Reports* **17**, 2456-2464, doi:10.3892/mmr.2017.8185 (2018).
- 169 Huang, M., Su, E., Zheng, F. & Tan, C. Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. *Food & Function* **8**, 3198-3208, doi:10.1039/c7fo00508c (2017).

- 170 Li, J. *et al.* Vitamin E TPGS modified liposomes enhance cellular uptake and targeted delivery of luteolin: An in vivo/in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* **512**, 262-272, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.037 (2016).
- 171 Zheng, S. *et al.* Biodegradable micelles enhance the antiglioma activity of curcumin in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine* **11**, 2721-2736, doi:10.2147/ijn.s102450 (2016).
- 172 Zheng, S. *et al.* Application of luteolin nanomicelles anti-glioma effect with improvement in vitro and in vivo. *Oncotarget* **8**, 61146-61162, doi:10.18632/oncotarget.18019 (2017).
- 173 Karim, R. *et al.* Development and evaluation of injectable nanosized drug delivery systems for apigenin. *International Journal of Pharmaceutics* **532**, 757-768, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.04.064 (2017).
- 174 Huang, Y. *et al.* Enhanced Solubility and Bioavailability of Apigenin via Preparation of Solid Dispersions of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **18**, 168-182 (2019).
- 175 Bhattacharya, S. *et al.* Apigenin loaded nanoparticle delayed development of hepatocellular carcinoma in rats. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **14**, 1905-1917, doi:10.1016/j.nano.2018.05.011 (2018).
- 176 Sabzichi, M. *et al.* Luteolin-loaded Phytosomes Sensitize Human Breast Carcinoma MDA-MB 231 Cells to Doxorubicin by Suppressing Nrf2 Mediated Signalling. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**, 5311-5316, doi:10.7314/apjcp.2014.15.13.5311 (2014).
- 177 Barrajon-Catalan, E. *et al.* Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level. *Cancer Letters* **290**, 192-203, doi:10.1016/j.canlet.2009.09.010 (2010).
- 178 Catania, A., Barrajon-Catalan, E., Nicolosi, S., Cicerata, F. & Micol, V. Immunoliposome encapsulation increases cytotoxic activity and selectivity of curcumin and resveratrol against HER2 overexpressing human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **141**, 55-65, doi:10.1007/s10549-013-2667-y (2013).
- 179 Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* **1**, 2315-2319, doi:10.1038/nprot.2006.339 (2006).
- 180 Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. N. S. & Searson, P. C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **4**, doi:10.3389/fbioe.2016.00012 (2016).
- 181 Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* **148**, 3-15, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012 (2010).



- 182 Pijuan, J. *et al.* In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**, doi:10.3389/fcell.2019.00107 (2019).
- 183 Way, T. D., Kao, M. C. & Lin, J. K. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett.* **579**, 145-152, doi:10.1016/j.febslet.2004.11.061 (2005).
- 184 Liu, J. *et al.* Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9. *Molecular Medicine Reports* **13**, 2401-2408, doi:10.3892/mmr.2016.4872 (2016).
- 185 Kanwal, R., Moreton, S., Franco, D. & Gupta, S. Luteolin-mediated increase in miR-26a inhibits prostate cancer cell growth and induces cell cycle arrest targeting EZH2. *Cancer Research* **78**, doi:10.1158/1538-7445.am2018-251 (2018).
- 186 Huang, L. M., Jin, K. T. & Lan, H. R. Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase. *Oncology Letters* **17**, 3842-3850, doi:10.3892/ol.2019.10052 (2019).
- 187 Oak, C. *et al.* Diosmetin suppresses human prostate cancer cell proliferation through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *International Journal of Oncology* **53**, 835-843, doi:10.3892/ijo.2018.4407 (2018).
- 188 Kalmdemirtas, F. D. *et al.* Cytotoxic Effects of Some Flavonoids and Imatinib on the K562 Chronic Myeloid Leukemia Cell Line: Data Analysis Using the Combination Index Method. *Balkan Medical Journal* **36**, 96-105, doi:10.4274/balkanmedj.galenos.2018.2017.1244 (2019).
- 189 Way, T. D., Kao, M. C. & Lin, J. K. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 4479-4489, doi:10.1074/jbc.M305529200 (2004).
- 190 Anson, D. M. *et al.* Luteolin Decreases Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Glioblastoma Cell Lines. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **123**, 678-686, doi:10.1111/bcpt.13077 (2018).
- 191 Im, E., Yeo, C. & Lee, E. O. Luteolin induces caspase-dependent apoptosis via inhibiting the AKT/osteopontin pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep-1 cells. *Life Sciences* **209**, 259-266, doi:10.1016/j.lfs.2018.08.025 (2018).
- 192 Nazim, U. M. & Park, S. Y. Luteolin sensitizes human liver cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via autophagy and JNK-mediated death receptor 5 upregulation. *International Journal of Oncology* **54**, 665-672, doi:10.3892/ijo.2018.4633 (2019).

- 193 Liu, J. *et al.* Diosmetin inhibits cell proliferation and induces apoptosis by regulating autophagy via the mammalian target of rapamycin pathway in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Oncology Letters* **12**, 4385-4392, doi:10.3892/ol.2016.5301 (2016).
- 194 Qiao, J. *et al.* Diosmetin triggers cell apoptosis by activation of the p53/Bcl-2 pathway and inactivation of the Notch3/NF-kappa B pathway in HepG2 cells. *Oncology Letters* **12**, 5122-5128, doi:10.3892/ol.2016.5347 (2016).
- 195 Ninomiya, M., Nishida, K., Tanaka, K., Watanabe, K. & Koketsu, M. Structure-activity relationship studies of 5,7-dihydroxyflavones as naturally occurring inhibitors of cell proliferation in human leukemia HL-60 cells. *Journal of Natural Medicines* **67**, 460-467, doi:10.1007/s11418-012-0697-0 (2013).
- 196 Pal, M. K. *et al.* Synergistic Effect of Graphene Oxide Coated Nanotised Apigenin with Paclitaxel (GO-NA/PTX): A ROS Dependent Mitochondrial Mediated Apoptosis in Ovarian Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **17**, 1721-1732, doi:10.2174/1871520617666170425094549 (2017).
- 197 Das, S., Das, J., Samadder, A., Boujedaini, N. & Khuda-Bukhsh, A. R. Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Experimental Biology and Medicine* **237**, 1433-1448, doi:10.1258/ebm.2012.012148 (2012).
- 198 Kittiratphatthana, N., Kukongviriyapan, V., Prawan, A. & Senggunprai, L. Luteolin induces cholangiocarcinoma cell apoptosis through the mitochondrial-dependent pathway mediated by reactive oxygen species. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **68**, 1184-1192, doi:10.1111/jphp.12586 (2016).
- 199 Koosha, S., Mohamed, Z., Sinniah, A. & Alshawsh, M. A. Investigation into the Molecular Mechanisms underlying the Anti-proliferative and Anti-tumorigenesis activities of Diosmetin against HCT-116 Human Colorectal Cancer. *Scientific Reports* **9**, doi:10.1038/s41598-019-41685-1 (2019).
- 200 Xia, Y. *et al.* Apigenin Suppresses the IL-1 beta-Induced Expression of the Urokinase Type Plasminogen Activator Receptor by Inhibiting MAPK-Mediated AP-1 and NF-kappa B Signaling in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 7663-7673, doi:10.1021/acs.jafc.8b02351 (2018).
- 201 Shukla, S. & Gupta, S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle* **6**, 1102-1114, doi:10.4161/cc.6.9.4146 (2007).
- 202 Henriques, J., Fale, P. L., Pacheco, R., Florencio, M. H. & Serralheiro, M. L. Phenolic compounds from *Actinidia deliciosa* leaves: Caco-2 permeability, enzyme inhibitory activity and cell protein profile studies. *Journal of King Saud University Science* **30**, 513-518, doi:10.1016/j.jksus.2017.07.007 (2018).

- 203 Zheng, Y. *et al.* Study on the compatibility interactions of formula Ding-Zhi-Xiao-Wan based on their main components transport characteristics across Caco-2 monolayers model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **159**, 179-185, doi:10.1016/j.jpba.2018.06.067 (2018).
- 204 Perez-Sanchez, A. *et al.* Evaluation of the intestinal permeability of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract polyphenols and terpenoids in Caco-2 cell monolayers. *Plos One* **12**, doi:10.1371/journal.pone.0172063 (2017).
- 205 Wu, S., Xu, W., Wang, F.-R. & Yang, X.-W. Study of the Biotransformation of Tongmai Formula by Human Intestinal Flora and Its Intestinal Permeability across the Caco-2 Cell Monolayer. *Molecules* **20**, 18704-18716, doi:10.3390/molecules201018704 (2015).
- 206 Lee, J. A., Ha, S. K., Kim, Y. C. & Choi, I. Effects of friedelin on the intestinal permeability and bioavailability of apigenin. *Pharmacological Reports* **69**, 1044-1048, doi:10.1016/j.pharep.2017.04.012 (2017).
- 207 Androutsopoulos, V. P., Mahale, S., Arroo, R. R. J. & Potter, G. Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation. *Oncology Reports* **21**, 1525-1528, doi:10.3892/or\_00000384 (2009).
- 208 Androutsopoulos, V., Wilsher, N., Arroo, R. R. J. & Potter, G. A. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. *Cancer Letters* **274**, 54-60, doi:10.1016/j.canlet.2008.08.032 (2009).
- 209 Pohl, C., Will, F., Dietrich, H. & Schrenk, D. Cytochrome p450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: Modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 10262-10268, doi:10.1021/jf061791c (2006).
- 210 Androutsopoulos, V. P. & Spandidos, D. A. The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation. *Journal of Nutritional Biochemistry* **24**, 496-504, doi:10.1016/j.jnutbio.2012.01.012 (2013).
- 211 Zeng, C. *et al.* Chitosan coated chlorogenic acid and rutin composite phospholipid liposomes: Preparation, characterizations, permeability and pharmacokinetic. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **31**, 2095-2102 (2018).
- 212 Ravisankar, S. *et al.* Combined cereal and pulse flavonoids show enhanced bioavailability by downregulating phase II metabolism and ABC membrane transporter function in Caco-2 model. *Food Chemistry* **279**, 88-97, doi:10.1016/j.foodchem.2018.12.006 (2019).
- 213 Perez-Sanchez, A. *et al.* Intestinal Permeability Study of Clinically Relevant Formulations of Silibinin in Caco-2 Cell Monolayers. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, doi:10.3390/ijms20071606 (2019).

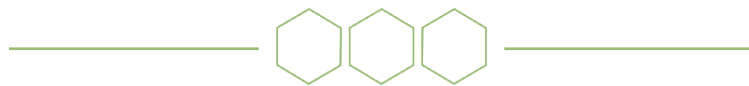
- 214 Zhang, Y. *et al.* Use of UHPLC-QTOF-MS/MS with combination of in silico approach for distributions and metabolites profile of flavonoids after oral administration of Niu Huang Shangqing tablets in rats. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1114**, 55-70, doi:10.1016/j.jchromb.2019.03.021 (2019).
- 215 Zhu, S. J. *et al.* Luteolin shows antidepressant-like effect by inhibiting and downregulating plasma membrane monoamine transporter (PMAT, Slc29a4). *Journal of Functional Foods* **54**, 440-448, doi:10.1016/j.jff.2019.01.048 (2019).
- 216 Herranz-Lopez, M. *et al.* Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. *Phytomedicine* **19**, 253-261, doi:10.1016/j.phymed.2011.12.001 (2012).
- 217 Chan, B. C. L. *et al.* Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Phytomedicine* **20**, 611-614, doi:10.1016/j.phymed.2013.02.007 (2013).
- 218 Giommarelli, C. *et al.* The enhancement of antiproliferative and proapoptotic activity of HDAC inhibitors by curcumin is mediated by Hsp90 inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 995-1004, doi:10.1007/s00018-009-0233-x (2010).
- 219 Li, Y., Yuan, Y.-Y., Meeran, S. M. & Tollefsbol, T. O. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ER alpha) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER alpha-negative breast cancer cells. *Molecular cancer* **9**, doi:10.1186/1476-4598-9-274 (2010).
- 220 Ryu, S., Park, S., Lim, W. & Song, G. Effects of luteolin on canine osteosarcoma: Suppression of cell proliferation and synergy with cisplatin. *Journal of Cellular Physiology* **234**, 9504-9514, doi:10.1002/jcp.27638 (2019).
- 221 Yiannakopoulou, E. C. Interaction of Green Tea Catechins with Breast Cancer Endocrine Treatment: A Systematic Review. *Pharmacology* **94**, 245-248, doi:10.1159/000369170 (2014).



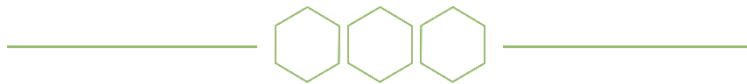
Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 8. Anexo





**Artículos científicos  
relacionados con la temática  
de la Tesis Doctoral**









Review

# Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures

María Losada-Echeberría <sup>1</sup> , María Herranz-López <sup>1</sup>, Vicente Micol <sup>1,2</sup>  
and Enrique Barrajon-Catalán <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cell Biology (IBMC), Miguel Hernández University (UMH),  
Avda. Universidad s/n, Elche 03202, Spain; mlosada@umh.es (M.L.-E.); mherranz@umh.es (M.H.-L.);  
vmicol@umh.es (V.M.)

<sup>2</sup> CIBER, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III  
(CB12/03/30038), Palma de Mallorca 07122, Spain

\* Correspondence: e.barrajon@umh.es; Tel.: +34-965-222-586

Received: 4 October 2017; Accepted: 3 November 2017; Published: 7 November 2017

**Abstract:** Breast cancer is one of the most common neoplasms worldwide, and in spite of clinical and pharmacological advances, it is still a clinical problem, causing morbidity and mortality. On the one hand, breast cancer shares with other neoplasms some molecular signatures such as an imbalanced redox state, cell cycle alterations, increased proliferation and an inflammatory status. On the other hand, breast cancer shows differential molecular subtypes that determine its prognosis and treatment. These are characterized mainly by hormone receptors especially estrogen receptors (ERs) and epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Tumors with none of these receptors are classified as triple negative breast cancer (TNBC) and are associated with a worse prognosis. The success of treatments partially depends on their specificity and the adequate molecular classification of tumors. New advances in anticancer drug discovery using natural compounds have been made in the last few decades, and polyphenols have emerged as promising molecules. They may act on various molecular targets because of their promiscuous behavior, presenting several physiological effects, some of which confer antitumor activity. This review analyzes the accumulated evidence of the antitumor effects of plant polyphenols on breast cancer, with special attention to their activity on ERs and HER2 targets and also covering different aspects such as redox balance, uncontrolled proliferation and chronic inflammation.

**Keywords:** breast cancer; polyphenols; luminal; TNBC; redox balance; apoptosis; autophagy; inflammation; ER; HER2

## 1. Introduction

Nowadays, cancer is one of the main causes of mortality worldwide. In 2012, 14 million new cases were diagnosed, and there were 8.2 million cancer-related deaths [1]. Breast cancer is the most common tumor in occidental women; one in eight women will have a breast tumor during their lifetime, and every year, up to 1.4 million new cases are diagnosed worldwide [1]. An annual mortality rate of about 450,000 is estimated, which accounts for 20–30% of all tumors.

Currently, treatments are based mainly on two molecular markers: hormone receptors and epidermal growth factor receptor 2 (HER2). The expression of these molecular markers determines both prognosis and treatment. Although new therapies against breast cancer have been able to reduce mortality, the prognosis, especially in the more advanced stages, remains unpromising, and therefore, further research in this field is needed [2]. The main advances have been obtained for HER2 positive tumors where monoclonal antibodies such as trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) have improved prognosis in HER2 overexpressing tumors [3]. Unfortunately, even in these cases, resistance is also frequent, leading

to nonspecific therapeutic options. In addition, approximately 10–20% of breast tumors are considered triple negative, which implies that no specific therapy is available, and only classic chemotherapy may be applied.

In this clinical scenario, new efforts have been made to obtain new drugs for breast cancer treatment leading to several promising molecules [4]. However, new molecules are still required. Natural compounds from different origins such as vegetal [5], microbial [6] and marine [7] species are a source of new molecules demonstrating activity against cancer and other diseases. These compounds derive from the secondary metabolism of these organisms and have been selected by nature through evolution. Between natural compounds, polyphenols have emerged as one of the main families of compounds with potential biological activity in many diseases such as cancer [8–13], diabetes [14,15], inflammation [16–19], obesity-related diseases [20], neurodegenerative disorders [21–23], bacterial [24–27] and viral infections [28,29] or cardiovascular diseases [30]. In addition, they possess a relevant antioxidant activity [24,31–35], which is the basis of part of their biological activity.

Polyphenols are widely distributed in fruits, vegetables, tea, essential oils and cereals; their molecular structure is characterized by the presence of one or more phenolic rings substituted with at least one hydroxyl group. Different classes and subclasses of polyphenols generate a large structural variability that is characterized by the number of phenolic rings they possess and the moieties that substitute their aromatic rings (see <http://phenol-explorer.eu/compounds/classification> for an updated classification). The main groups of polyphenols are: phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans (Figure 1).

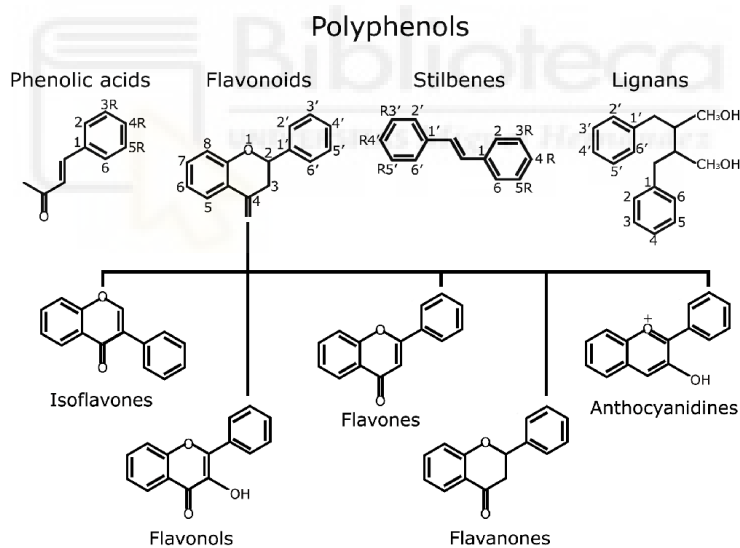


Figure 1. Polyphenols structure and classification.

As mentioned above, some polyphenols have demonstrated anticancer activity, showing biological activity against most of the main cancer molecular targets such as kinases, pre- and anti-apoptotic proteins, enzymes that regulate energy metabolism and regulatory proteins linked to proliferation and signaling pathways [36]. Their broad activity may be attributed to several mechanisms, including the interaction and modulation of a wide range of proteins, enzymes and membrane receptors, regulation of gene expression, apoptosis induction, vasodilation and modulation of cell pathways [37–42]. In addition, polyphenols have preventive effects against tumor initiation through numerous

mechanisms, such as the avoidance of genotoxic molecule formation, the blockade of mutagenic transforming enzyme activity [43], the regulation of Phase I and II enzymes, such as cytochrome P450s (CYP) [44] and S-transferase (GST) [45], as well as preventing DNA damage [46,47].

For all these reasons, new treatments based on polyphenolic compounds are being studied as an alternative and/or adjuvant therapies in these pathologies using different models [21]. Potential benefits of their dietary intake on human health and, more specifically, on cancer risk (including breast cancer) have been also reviewed [48,49]. Specifically, for breast cancer, interesting results have been obtained with a mixture of tea extract and quercetin [50], with *Pinus radiata* [51], Indian lotus [52], *Hypogymnia physodes* lichen [53], *Morinda citrifolia* [54] or with olive leaf extracts [55–58], among others.

This review describes the different breast cancer types, molecular biomarkers and their main treatments. A compilation of the main molecular breast cancer targets and the use of polyphenols to address them is reviewed, covering different aspects such as redox balance, uncontrolled proliferation and chronic inflammation, with particular interest in ER (estrogen receptor) and HER2 and the use of polyphenols to modulate their pathways.

## 2. Breast Cancer Biomarkers Determine Both Prognosis and Treatment

The identification of molecular biomarkers plays a significant role in the diagnosis and prognosis of breast cancer. They represent therapeutic targets, and their expression is used to classify cancers according to the different molecular subtypes (Table 1). The major biomarkers of breast cancer include the hormonal estrogen and progesterone receptors (ER and PR) and HER2/ERBB2 and, with less relevance, Ki-67 protein [59]. These markers have been extensively studied, and their expression correlates with differences in tumor behavior and patient response to treatments [60,61]:

- Hormone receptors, ERs and PR, are the main factors responsible for hormone response. Breast cancer is a hormone-dependent tissue, and this response is controlled by these receptors [62,63]. ER and PR expression confer a better prognosis and are the basis of hormonal therapy.
- HER2 is a membrane receptor involved in cell proliferation signal transduction. It is present in normal cells and in most tumors, but in 5–15% of breast tumors is overexpressed, increasing tumor aggressiveness [59]. These tumors are very often sensitive to treatment with anti-HER2 treatments, such as humanized monoclonal antibodies or specific inhibitors [64].
- Ki-67: is a protein marker that can be only detected in proliferating cells and currently is used to rate tumor proliferation, particularly lymphomas, breast, endocrine and brain cancers [65]. Indeed, Ki-67 contributes greatly to the Oncotype score [66]. Tumors with high proliferation rates (>15%) have a poor prognosis [65].

Using these molecular markers, breast cancer can be divided into four major molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2 type and triple negative breast cancer (TNBC) [67–69]. This division determines treatment as shown in Table 1. Overexpression of HER2 is related to the lack of expression of hormone receptors in most cases. The same situation occurs with Ki67, which is usually elevated in cells that do not express these receptors. Between Ki67 and HER2, no relationship has been found.

**Table 1.** Breast cancer molecular subtypes and their main treatments. Representative cell lines for each subtype are also shown.

Subtype	ER/PR	HER2	Ki67	Treatment	Cell lines
Luminal A	+/+	–	<15%	Antihormonal	MCF7, T47D
Luminal B	+/+	–/+	>15%	Antihormonal	BT474
HER2-type	–/–	+		Anti-HER2	SkBr3, AU565
TNBC	–/–	–/–	>15%	Chemotherapy	MDA-MB231

Luminal A tumors are hormone dependent, with hormone receptors positive expression (ER/PR-positive). They are HER2 negative and present one or two tumor grades. They represent

30–70% of breast cancers [70–72] and have the best prognosis, with high survival and low recurrence rates [73–75].

Luminal B tumors tend to be ER/PR-positive. They can be HER2-negative or positive; in this last case, some authors consider it as a new sub-type called Luminal C [76], but this classification is not widespread. They are also characterized by a higher tumor grade, a larger tumor size and a positive lymph node dissemination. Patients with Luminal B tumors are usually diagnosed at more advanced ages than in cases with Luminal A [75,77]. Compared to Luminal A tumors, they also tend to have factors that lead to a poorer prognosis, mainly an increase in Ki67 protein of 15–20% [78,79]. The prevalence of Luminal B tumors is approximately 10–20% [70–72] and still shows high survival rates, although not as high as those of Luminal A tumors [75]. Treatments for both Luminal A and B are based on hormone therapy regimens [80], which is based on the use of SERMs (selective estrogen receptor modulators) such as tamoxifen or fulvestrant and aromatase inhibitors like anastrozole, exemestane and letrozole [81].

HER2-type tumors are characterized by being ER/PR-negative, overexpressing HER2, having lymph node positive implication and present poorer tumor grade [74,75]. Patients with HER2 tumors are usually diagnosed at an earlier age than Luminal A and Luminal B [75]. Approximately 5–15% of breast cancers are HER2-positive [71,72] and can be treated with specific anti-HER2 drugs. This group includes monoclonal antibodies like trastuzumab and pertuzumab and specific HER2 inhibitors like lapatinib [64]. Before these drugs were available, HER2-type tumors had a rather poor prognosis [71,82].

TNBC encompasses all tumors that are negative for ER, PR and HER2. It is considered the most metastatic type of breast cancer and has highly invasive properties, is larger, has a poorer prognosis with a high probability of relapse, no response to hormonal therapy and has nodal involvement. Around 10–20% of tumors correspond to triple negative tumors [70–72]. There are several approaches to counteract TNBC, but all based on classical chemotherapy using anthracyclines, taxanes, poly(ADP-ribose) polymerase protein inhibitors and platinum-containing chemotherapeutic agents [83].

### 3. Breast Cancer Signatures and Polyphenols

#### 3.1. Redox Balance

Oxidative stress is caused by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the efficacy of the endogenous antioxidant system. Tissues are continuously exposed to free radicals derived from metabolism or due to external factors such as pollution or radiation [84–86]. In fact, ROS participate in physiological functions such as metabolism signaling and defense against infections [87,88]. However, uncontrolled ROS production or accumulation can induce lipid peroxidation, protein modifications and DNA damage. These events lead to membrane alterations, protein dysfunctions and genetic alterations, all of which are linked to carcinogenesis and tumor progression.

Balance between oxidant species and antioxidants (redox balance) is essential to maintain a healthy cell status. Breast cancer is characterized by a systemic prooxidant status [89], and an increased ROS presence is determinant for some relevant events such as tumor progression mediated by stromal cells [90]. However, ROS can play a dual role [91], not only in breast [92], but in all cancers. Cells have several mechanisms to transform and eliminate ROS and avoid their harmful effects, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) or glutathione peroxidase (GTX) enzymes [93–95]. The synergistic action between these enzymes, vitamins and exogenous antioxidants such as polyphenols allows neutralizing free radicals and modulating cellular signaling [96].

Initially, increased ROS production leads to a pro-oncogenic situation as it provokes two crucial effects: mitochondrial dysfunction that conduces to protein oxidation, lipid peroxidation and DNA damage. On the other hand, once tumor cells have developed, an increase in ROS presence can lead to tumor cell death. This fact has been linked to some anticancer drugs such as doxorubicin and paclitaxel.

Polyphenols can participate in these two situations. First, it is generally admitted that polyphenols are antioxidants and therefore counteract ROS production and inhibit oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction by acting as chemo-preventive agents [97,98]. For this reason, the preventive character of polyphenols acquired through diet in diseases such as cancer [99,100], diabetes [101,102] or atherosclerosis [103,104] has been studied.

However, there is increasing evidence suggesting that under certain conditions, polyphenols can act as prooxidants, leading to tumor cell death [105,106]. For example, it has been shown that in systems containing active redox metals such as copper, some polyphenols show prooxidant activity, catalyzing their redox cycle and leading to ROS formation [107,108]. Since copper levels in cancer cells compared to healthy cells are increased [109], this prooxidant mechanism would present preferential cytotoxicity against cancer cells, leaving the normal cells undamaged. This effect has been demonstrated using polyphenols like luteolin, apigenin, epigallocatechin-3-gallate and resveratrol [110].

### 3.2. Uncontrolled Proliferation

One of the main characteristics of tumor cells, no matter their origin, is their ability to grow and proliferate in an uncontrolled way. Cellular proliferation is mainly linked to cell cycle progression. This cycle shows different checkpoints in which the cell examines the internal and external signals and decides whether to proceed with cell division or not. This uncontrolled cell division is caused by a malfunction of these checkpoints in the cell cycle [111,112]. The most important regulators of the cell cycle are proteins called cyclins, enzymes called cyclin-dependent kinases (CDKs) and anaphase-promoting enzymatic complex (APC/C) [113,114]. In addition, the active CDK complexes are regulated by binding to CDK inhibitors (p21 and p27) and by other kinases and phosphatases, which control the cell cycle by balancing CDK activity. Variations in the concentration of these inhibitors can alter the normal sequence of the cell cycle as occurs in some tumors or in aged cells.

Polyphenols can act by modulating cyclins, Cdk's or APC/C causing cell cycle arrest [115,116]. This cytostatic activity has been also studied in breast cancer, where some polyphenolic compounds have demonstrated their cytostatic activity. For example, ginnalins A–C induce cell cycle arrest in the S and G2/M phases in colon cancer HCT-116 cells and breast cancer MCF-7 cells by decreasing cyclin A and D1 levels [117]. Green tea polyphenols induce cell cycle arrest at G1/G0 phase in breast cancer MCF-7 cells [118]. Polyphenolic extracts from hawthorn fruit have shown a cytostatic effect on MCF-7 breast cancer cells by blocking the cycle in S phase [119]. Ellagic acid induces cell cycle arrest at G0–G1 in human breast cancer MCF-7 cells mediated by a cyclin A2 and cyclin E2 downregulation and an upregulation of the CDK-inhibitors *p21<sup>Cip1</sup>*, *p15* and *p19* [120].

In addition to cytostatic activity, however, uncontrolled proliferation can be also treated through cytotoxic mechanisms like apoptosis, autophagy, necrosis or necroptosis. Polyphenols can participate in all these mechanisms as described below.

#### 3.2.1. Apoptosis

Apoptosis is the main mechanism of cell-programmed death. It is characterized by a series of molecular processes that result in cell membrane blebbing, nuclear and chromosomal DNA fragmentation, chromatin condensation, fragmentation and the translocation of phosphatidylserine to the outer face of the plasma membrane, which means that they are eliminated by macrophages [121–123].

There are two different apoptotic pathways, mainly differentiated by their starting stimuli. These two pathways may overlap and share some molecular targets as caspases [121]. On the one hand, the extrinsic pathway is mediated by ligands that bind to receptors on the cell surface. Alternatively, the intrinsic pathway is mediated by cellular stress or by DNA injury. There are several molecular mechanisms that tumor cells use to suppress apoptosis. For example, tumor cells may acquire resistance to apoptosis by downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 expression or mutation of the pro-apoptotic BAX protein. Expression of both is regulated by the tumor suppressor gene p53 [124], which is mutated in a large number of cancer types [125].

As occurred in previous sections, polyphenols can act over different stages of apoptosis. For example, anti-apoptotic Bcl-2 expression is decreased in human breast cancer cell lines, MCF-7 and T47D with a silibinin treatment [126]. Besides, silibinin upregulated phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-3-phosphatase (PTEN) and caused a slight increase in p21, thus promoting apoptosis [127,128]. The treatment with Annurca apple polyphenolic extract increases the levels of p53, p21 and the pro-apoptotic ratio of Bax/Bcl-2 in parallel with caspase-9, -6 and -7, in MCF-7 breast cancer cells [129]. Fruit peel polyphenolic extract from different sources (red grape, blackberry, black cherry, black currant, elderberry, blackthorn and plum) induced caspase-dependent cell death associated with an increase in oxidative stress, causing the release of pro- and anti-apoptotic mitochondrial proteins from the Bcl-2 family in breast cancer MCF-7 cells [130]. Oleuropein induced apoptosis due to upregulation of both p53 and Bax gene expression levels and downregulation of Bcl2 in human breast cancer MCF-7 cells [131] and in the HepG2 human hepatoma cell line [132].

Tea polyphenols such as epigallocatechin gallate (EGCG) downregulate telomerase activity in breast cancer cells thereby increasing cellular apoptosis and inhibiting cellular proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells [133]. They can also inhibit cell growth and induce apoptosis through downregulation of survivin expression, a member of the inhibitor apoptosis protein family (IAP) that inhibits caspases and blocks cell death [134]; this effect has been observed in MCF-7, SK-BR-3 cells and MDA-MB-231 breast cancer cell models [135,136].

Artichoke polyphenols modify Bcl-2 and BAX expression in human breast cancer cell line MDA-MB-231, leading to a pro-apoptotic situation [137], which was accompanied with the upregulation of p21 [138].

Finally, other widely-distributed polyphenols such as resveratrol [139], quercetin [140] and catechin [141], promote apoptosis by decreasing IAP1 and survivin expression and increasing FAS ligand and its receptor [142] expression.

### 3.2.2. Autophagy

Initially, autophagy or cellular autodigestion is a route involved in the degradation of proteins and organelles that may be important in the pathogenesis of some diseases. Dysfunctions in the autophagy process are associated with cancer [143–145], neurodegeneration [146,147], aging [147,148] and infections [149,150]. The major proteins involved in the regulation of autophagy are the mammalian target of the rapamycin (mTOR), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), AKT kinase (AKT), Beclin-1 and p53 [151]. Activation of the PI3K/AKT pathway implies mTOR activation, leading to autophagy inhibition [152]; on the contrary, mTOR inhibition is related to autophagy activation. In addition to mTOR, there is a family of proteins called ATG (autophagy-related protein), such as LC3, ATG5 or ATG12, that are also involved in the regulation of this mechanism.

Some polyphenols can induce tumor cell death through autophagy activation; for example, *Solanum nigrum* L. extract decreased p-AKT levels causing mTOR inactivation and triggering autophagy in AU565 human breast cancer cells [153], as well as blueberry polyphenols in MDA-MB231 cells [154] and grape skin extracts in a murine model of breast cancer [155]. Mango polyphenols cause downregulation of mTOR in human breast ductal carcinoma in situ xenograft models [156].

Resveratrol increases levels of LC3 and its lipidic form, LC3-II, which induces autophagy [157] in human breast cancer MCF-7 cells [158], as well as polyphenol-enriched extract of *Pimenta dioica* berries does in human breast cancer MCF-7, MDA-MB231, SkBr3, BT474 and T47D cells [159] and carnosol in MDA-M231 cells [160]. In another study, it was observed that LC3-II, Beclin 1 and Atg 7 were significantly upregulated by resveratrol [161], inducing autophagy.

### 3.3. Chronic Inflammation and Pro-Inflammatory Factors

Chronic inflammation has been linked to the development of some tumors [162–164], and it is known that diseases such as pancreatitis [165], hepatic steatosis or Crohn's disease [166], which present chronic inflammation, significantly increase the risk of cancer. This direct relationship with

cancer development is also observed in infectious diseases that produce inflammation, such as hepatitis [167,168] or stomach infection by *Helicobacter pylori* [169–171].

Cell signaling by inflammatory cytokines had been shown to promote the development of cancer [172,173]. However, it was not until 2008, when the direct link between inflammation and cancer was first established, when it was observed that chronic inflammation causing DNA damage led to cancer development [174].

The abilities to inhibit or block the activity of NF- $\kappa$ B [175,176], cyclooxygenase (COX-2) [176–178] and lipoxygenase (LOX) [178,179] are the main causes of the anti-inflammatory capacity observed for polyphenols; thus, the role of phytochemicals in these pathways and in cancer-related inflammation has been extensively studied [180]. In this regard, individual polyphenols such as curcumin, EGCG and resveratrol have been reported to show anti-inflammatory effects [180], most of them by reducing NF- $\kappa$ B activation or expression. In addition to individual compounds, cocoa polyphenols decreased the nuclear levels of NF- $\kappa$ B and the expression of pro-inflammatory enzymes such as COX-2 and inducible NO synthase. Additionally, cocoa polyphenols effectively downregulated the levels of inflammatory markers induced by tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) by inhibiting NF- $\kappa$ B translocation and JNK phosphorylation [181].

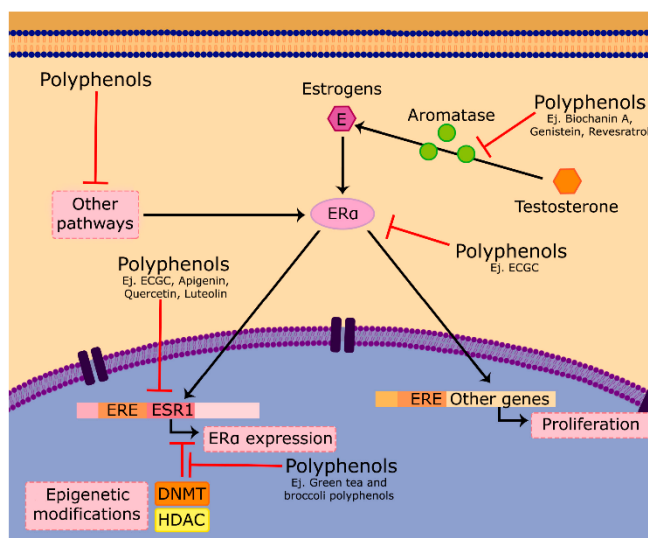
Pomegranate polyphenols also demonstrated anti-inflammatory activity as they were able to decrease NF- $\kappa$ B [182] and Nrf-2 [183] pathways in breast cancer cells. Cranberry extract also showed the ability to modulate PI3K/AKT, MAPK/ERK and STAT3 pathways, central nodes in the inflammatory signaling of cancer stem cells [184].

#### 3.4. ER and Estrogen Synthesis

Estrogens exert their biological action by binding to ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ , both of which are members of the nuclear receptor superfamily of transcription factors. Although both ERs can develop estrogen-related responses, ER- $\alpha$  is the one that plays an important role in breast cancer (in this review, the term “ER” is used for “ER- $\alpha$ ”).

The effects of polyphenols on ER and estrogen pathway is mainly based on three actions: anti-estrogenic mechanisms [185–187], changes in ER expression and aromatase modulation [188–190] (Figure 2). Anti-estrogenic mechanisms are based on the structural similarities between some groups of flavonoids, such as isoflavones and lignans, and estrogens. In fact, these compounds are considered as phytoestrogens [191–197] due to their natural origin and their ability to interact with ERs. Polyphenols may exert different effects according to the dose administered. Low dose treatments have an activating effect on the estrogen receptor, which triggers the proliferative response favoring tumor development. Conversely, high concentrations promote processes such as apoptosis or cell cycle blockage resulting in antitumor effects as mentioned above. In addition, ER expression is also regulated by some polyphenols, for example, EGCG, which downregulates ER- $\alpha$  protein, mRNA and gene promoter activity in MCF-7 [198] and ER and PR in T-47D [199] cell lines. There are so many additional examples of flavonoids, like apigenin, luteolin myricetin, anthocyanidins or quercetin, and other compounds, such as stilbenes, ellagitannins, sulforaphanes, curcuminoids and tocopherols, among others, that are extensively reviewed [197,200].

Aromatase enzyme, a member of the CYP superfamily of enzymes, is encoded by the CYP19 gene and supposed to be another target of breast cancer. Its function is to aromatize androgens, producing estrogens. One strategy to counteract the proliferative effect of estrogen in breast cancer is to use aromatase inhibitors. Some polyphenols have shown aromatase inhibiting properties like biochanin A, an isoflavone extracted from red clover, and genistein, which have been reported to inhibit the activity of the aromatase enzyme in SK-BR3 [201]. Resveratrol also inhibits aromatase by significantly reducing the CYP19-encoding mRNA abundance in SK-BR-3 cells [202]. Isoliquiritigenin inhibited aromatase mRNA expression and suppressed the activity of CYP19 promoters I.3 and II in MCF-7 cells [203].



**Figure 2.** Estrogenic response can be modulated by polyphenol activity. ER activation leads to cell proliferation by activating estrogen response element (ERE)-controlled genes, including their own ER gene (ESR1). Some polyphenols are able both to inhibit ER activity (antiestrogenic action) or ER expression and consequently reduce cell proliferation. The ER activity can also be regulated by some transactivation pathways including the Ras/Raf, PI3K/Akt, AMPK or PKC pathways; all of them can be also modified by polyphenols. ESR1 gene expression can be also regulated by epigenetic modifications through chromatin modifying enzymes such as DNMT (DNA methyltransferases) and HDAC (histone deacetylases). Finally, estrogen synthesis from androgens by aromatase can be also blocked by some polyphenols.

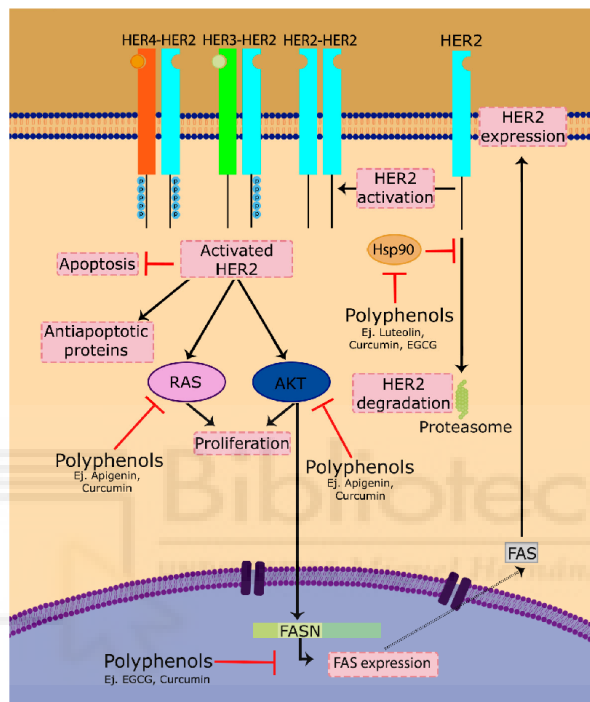
Besides the above-mentioned mechanisms, some polyphenols are able to transform ER-negative phenotypes into ER-positive, thereby improving prognosis and allowing treatment with SERMs such as tamoxifen. This transformation may be due to epigenetic modifications mediated by chromatin modifying enzymes such as DNMT (DNA methyltransferases) and HDAC (histone deacetylases) [204–206]. Methylation of the ESR1 gene encoding for ER is associated with the ER-negative phenotype and therefore supports the hypothesis that treatment with DNMT inhibitors and HDAC activators can promote ER expression by reversing the ER-negative phenotype to ER-positive [207]. Green tea polyphenols have been shown to modify chromatin by inhibiting DNMTs and eliciting ER expression in the TNBC MDA-MB231 cell line [208]. It has also been observed that with a combined treatment of green tea extract and broccoli shoots, the epigenetic reactivation of ER is triggered, which in turn increases the sensitivity to tamoxifen in ER-negative breast cancer MDA-MB-231 and MDA-MB-157 cells.

### 3.5. HER2/ErRB Overexpression

HER2, also termed ERBB2 or EGFR2, is overexpressed in more than 30% of breast cancers and has been shown to play an important role in the progression of certain aggressive breast cancers. HER2 is a trans-membrane receptor tyrosine kinase that activates multiple proliferative signaling pathways, including PI3K/Akt and Ras/MAPK. Upon activation, HER2 can both homo- or hetero-dimerize with other HER family receptors, leading to signal transduction and cell proliferation (Figure 3). This is the main reason for which HER2 overexpression conduces to an abnormal proliferation and cancer



spread. In addition to this main mechanism, however, it has also been shown that several apoptotic mechanisms are deregulated in cells overexpressing HER2 [209,210], and some anti-apoptotic proteins including Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 are overexpressed [211]. These two additional mechanisms contribute to tumor cell survival and the spread of the cancer (Figure 3).



**Figure 3.** Polyphenols modulate the HER2 pathway. The HER2 membrane receptor, when activated, dimerizes with other HER2 (homodimerization) or other HER family receptor (heterodimerization) and transduces proliferation signals to downstream pathways such as the Ras/Raf or PI3K/Akt routes. This activation also inhibits apoptotic signals and promote antiapoptotic mechanisms. In addition, HER2 expression can be modulated by FASN, and some polyphenols are able to modify this action by actuating on FASN activity and/or expression. Finally, Hsp90 chaperone is required for HER2 to be functional, and some polyphenols modify this interaction leading to HER2 degradation by proteasome.

Nowadays, the most commonly-used therapy against HER2-positive tumors is the monoclonal antibody trastuzumab [212]. This treatment has positively revolutionized the prognosis of this kind of tumor; however, the main problem presented by these patients is the development of resistance to trastuzumab. Polyphenols can sensitize HER2-positive cells through different mechanisms: by decreasing its activation or downloading its expression. For example, some secoiridoids such as oleuropein promote a downregulation of HER2 by blocking ATP binding to the tyrosine kinase domain of the protein [213,214]. Silybin and silybin-phosphatidylcholine exhibit dose-dependent cell growth inhibitory effects and downregulation of HER2 in SkBr3 cells [215]. Apigenin induces apoptosis by depletion of HER2 protein and, in turn, suppression of signaling of the HER2/HER3-PI3K/Akt pathway [216]. HER2, p-Akt, p-MAPK and NF- $\kappa$ B oncoprotein levels decreased in a dose- and

time-dependent way in BT-474, MCF-7, MDA-MB-231 and SkBr3-hr (a herceptin-resistant strain from SkBr3 breast cancer cells) when treated with curcumin [217].

On the other hand, HER2 needs to interact with Hsp90 and its chaperone to acquire its function [218,219], so another possible therapeutic approach is the use of inhibitors of the HER2-Hsp90 binding, causing the dissociation of HER2 from its chaperone and, consequently, leading to HER2 degradation by the proteasome [220,221]. It has been observed that some polyphenols such as luteolin [222], geraniin [223], curcumin [224] or EGCG [225] are inhibitors of Hsp90 and therefore affect the HER2-Hsp90 binding.

Fatty acid synthase (FASN) has been linked with several types of cancer [226]. Overexpression of HER2 has been shown to increase FASN translation, which alters the activity of the mTOR and the PI3K/AKT signaling pathway in breast cancer cells [227]. FASN inhibition induces apoptosis and creates cytotoxicity [228–230], but also causes a marked decrease in the active forms of the HER2 protein, indicating that the HER2 oncogene presents positive feedback with FASN to ensure de novo overactive biogenesis of fatty acids. Consequently, FASN inhibition correlates with an inhibition of HER2 (Figure 3). Some polyphenols, such as curcumin [231], some olive oil lignans [232] and EGCG [233] have shown anticancer activity on HER-positive models through this FASN-linked mechanism.

#### 4. Conclusions

Breast cancer is a heterogenic oncological disease in which, in addition to common cancer signatures, estrogenic response and HER2 expression constitute two clinical and molecular targets that must be taken into account.

As stated in this review, polyphenols are natural compounds that have demonstrated antitumor activity reaching different molecular targets. Some of them, especially EGCG, curcumin and flavonoids, such as luteolin, apigenin or quercetin, seem to be the most promising ones according to the current studies. Their promiscuous activity against different molecular targets is quite relevant and suggests that multitargeting therapy can be a future strategy for breast cancer treatment. However, additional aspects such as polyphenols' bioavailability and toxicity must be addressed. Polyphenols' bioavailability has been thoroughly studied for many polyphenols, especially those with the most relevant biological activity [234]. In general, polyphenols' bioavailability is low, and most of them are classified as Class IV by the Biopharmaceutical Classification System (BCS) (low permeability, low solubility) [235]. However, numerous studies have explored strategies to increase polyphenols' bioavailability, for example using different encapsulation techniques [236–239] or using pharmaceutical dispersions [240]. Intravenous administration represents an option for many anticancer drugs with poor bioavailability, so this could be a solution too for those polyphenols showing low bioavailability.

Toxicity is, as mentioned above, another relevant aspect to be studied. As occurred with their bioavailability, polyphenols' toxicity has been deeply studied [241–243], and in most cases, only very high doses present relevant toxic consequences. Moreover, new approaches to predict toxicity using bioinformatic tools such as admetSAR and DataWarrior [244,245] are also available, and new alternative methods both reducing and/or replacing animal use have been introduced in preclinical research (see <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/animal-welfare.htm>). However, toxicity should not be a major problem since polyphenols are less toxic than most anticancer drugs.

All the accumulated evidence on the in vitro anticancer activity of polyphenols, as well as bioavailability and toxicity studies may be used to develop new anticancer drugs. Nevertheless, much preclinical research needs to be conducted before administration to oncologic patients with the required guaranties. In vivo studies and, especially, human clinical trials must be developed before real clinical use. However, most of these polyphenols can be obtained from the diet, allowing preventive or nutritional strategies that, although they must be challenged with clinical trials before being accepted, can be implemented in the short term as dietary recommendations. Some studies have been already conducted [48,49], but there is still a need for more evidence.

Future research must be focused on providing new and strong evidence about polyphenols' activity on every breast cancer signature. As mentioned above, preclinical and clinical evidence is scarce. New studies using omic sciences and in silico approaches could provide some of the pending results as occurred in other disciplines. Genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and fluxomics strategies are continuously increasing our knowledge about polyphenols' mechanism of action [246,247]. In silico techniques, such as molecular docking, are being used to identify new ligands for specific cancer molecular targets [248,249]. Epigenetic studies are also providing relevant information [250,251] on polyphenols' effects, but a global approach using all the updated knowledge is undoubtedly the main pending task.

**Acknowledgments:** Some of the investigations expressed in this review have been partially or fully supported by competitive public grants from the following institutions: AGL2011-29857-C03-03 and IDI-20120751 grants (Spanish Ministry of Science and Innovation), Projects AGL2015-67995-C3-1-R, AGL2015-67995-C3-2-R, AGL2015-67995-C3-3-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO); PROMETEO/2012/007, PROMETEO/2016/006, ACOMP/2013/093, ACIF/2010/162 and ACIF/2016/230 grants from Generalitat Valenciana and CIBER (CB12/03/30038, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III).

**Author Contributions:** María Losada-Echeberría gathered all the information and wrote the first version of the manuscript. María Herranz-López reviewed and added new information about polyphenols to the manuscript. Vicente Micol reviewed the manuscript and the English language. Enrique Barrajón-Catalán coordinated all the authors and edited and reviewed the different versions of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

HER2/ERB2	human epidermal growth factor receptor 2
CYP	cytochrome P450s
GST	s-transferase
TNBC	triple negative breast cancer
ER	estrogen receptor
PR	progesterone receptor
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
CAT	catalase
GTX	glutathione peroxidase
CDKs	cyclin-dependent kinases
APC/C	anaphase-promoting complex
PTEN	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-3-phosphatase
EGCG	epigallocatechin gallate
IAP	inhibitor apoptosis protein
mTOR	mammalian target of the rapamycin
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
AKT	AKT kinase
COX-2	cyclooxygenase
LOX	lipoxygenase
TNF- $\alpha$	Tumoral Necrosis Factor-alpha
DNMTs	DNA methyltransferases
HDACs	histone deacetylases
FASN	fatty acid synthase

## References

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Balduzzi, S.; Mantarro, S.; Guarneri, V.; Tagliabue, L.; Pistotti, V.; Moja, L.; D'Amico, R. Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *12*, CD006242.
4. Li, X.X.; Oprea-Ilie, G.M.; Krishnamurti, U. New developments in breast cancer and their impact on daily practice in pathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2017**, *141*, 490–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Singh, S.; Sharma, B.; Kanwar, S.S.; Kumar, A. Lead phytochemicals for anticancer drug development. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kawada, M.; Atsumi, S.; Wada, S.I.; Sakamoto, S. Novel approaches for identification of anti-tumor drugs and new bioactive compounds. *J. Antibiot.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ruiz-Torres, V.; Encinar, J.; Herranz-López, M.; Pérez-Sánchez, A.; Galiano, V.; Barrañón-Catalán, E.; Micol, V. An updated review on marine anticancer compounds: The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. *Molecules* **2017**, *22*, 1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Garcia-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Vazquez-Martin, A.; Menendez, J.A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 416–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kunnumakara, A.B.; Bordoloi, D.; Harsha, C.; Banik, K.; Gupta, S.C.; Aggarwal, B.B. Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 1781–1799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bae, J.; Kumazoe, M.; Yamashita, S.; Tachibana, H. Hydrogen sulphide donors selectively potentiate a green tea polyphenol EGCG-induced apoptosis of multiple myeloma cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Jahanafrooz, Z.; Motamed, N.; Bakhshandeh, B. Effects of miR-21 downregulation and silibinin treatment in breast cancer cell lines. *Cytotechnology* **2017**, *69*, 667–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tyszka-Czochara, M.; Bukowska-Strakova, K.; Majka, M. Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *106*, 260–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zenthofer, M.; Geisen, U.; Hofmann-Peiker, K.; Fuhrmann, M.; Kerber, J.; Kirchofer, R.; Hennig, S.; Peipp, M.; Geyer, R.; Piker, L.; et al. Isolation of polyphenols with anticancer activity from the baltic sea brown seaweed fucus vesiculosus using bioassay-guided fractionation. *J. Appl. Phycol.* **2017**, *29*, 2021–2037. [[CrossRef](#)]
14. Pereira, T.M.C.; Pimenta, F.S.; Porto, M.L.; Baldo, M.P.; Campagnaro, B.P.; Gava, A.L.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Coadjuvants in the diabetic complications: Nutraceuticals and drugs with pleiotropic effects. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gothai, S.; Ganesan, P.; Park, S.Y.; Fakurazi, S.; Choi, D.K.; Arulselvan, P. Natural phyto-bioactive compounds for the treatment of type 2 diabetes: Inflammation as a target. *Nutrients* **2016**, *8*, 461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Abiodun, O.O.; Rodriguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Gomez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Utrilla, M.P.; Rodriguez-Cabezas, M.E.; Galvez, J. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *192*, 309–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Choi, J.Y.; Desta, K.T.; Saralamma, V.V.G.; Lee, S.J.; Lee, S.J.; Kim, S.M.; Paramanatham, A.; Lee, H.J.; Kim, Y.-H.; Shin, H.-C.; et al. LC-MS/Ms characterization, anti-inflammatory effects and antioxidant activities of polyphenols from different tissues of Korean Petasites japonicus (Meowi). *Biomed. Chromatogr.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Liu, K.; Pi, F.; Zhang, H.; Ji, J.; Xia, S.; Cui, F.; Sun, J.; Sun, X. Metabolomics analysis to evaluate the anti-inflammatory effects of polyphenols: Glabridin reversed metabolism change caused by LPS in RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6070–6079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Nakajima, V.M.; Moala, T.; Caria, C.R.E.P.; Moura, C.S.; Amaya-Farfan, J.; Gambero, A.; Macedo, G.A.; Macedo, J.A. Biotransformed citrus extract as a source of anti-inflammatory polyphenols: Effects in macrophages and adipocytes. *Food Res. Int.* **2017**, *97*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Herranz-López, M.; Olivares-Vicente, M.; Encinar, J.A.; Barrañón-Catalán, E.; Segura-Carretero, A.; Joven, J.; Micol, V. Multi-targeted molecular effects of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols: An opportunity for a global approach to obesity. *Nutrients* **2017**, *9*, 907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Molino, S.; Dossena, M.; Buonocore, D.; Ferrari, F.; Venturini, L.; Ricevuti, G.; Verri, M. Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials. *Life Sci.* **2016**, *161*, 69–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Isac, S.; Panaitescu, A.M.; Spataru, A.; Iesanu, M.; Totan, A.; Udriste, A.; Cucu, N.; Peltecu, G.; Zagrean, L.; Zagrean, A.M. Trans-resveratrol enriched maternal diet protects the immature hippocampus from perinatal asphyxia in rats. *Neurosci. Lett.* **2017**, *653*, 308–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Reglodi, D.; Renaud, J.; Tamas, A.; Tizabi, Y.; Socias, S.B.; Del-Bel, E.; Raisman-Vozari, R. Novel tactics for neuroprotection in parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog. Neurobiol.* **2017**, *155*, 120–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. De Camargo, A.C.; Regitano-d'Arce, M.A.B.; Rasera, G.B.; Canniatti-Brazaca, S.G.; do Prado-Silva, L.; Alvarenga, V.O.; Sant'Ana, A.S.; Shahidi, F. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. *Food Chem.* **2017**, *237*, 538–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Paunovic, S.M.; Maskovic, P.; Nikolic, M.; Miletic, R. Bioactive compounds and antimicrobial activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) berries and leaves extract obtained by different soil management system. *Sci. Hort.* **2017**, *222*, 69–75. [[CrossRef](#)]
26. Chen, M.S.; Zhao, Z.G.; Meng, H.C.; Yu, S.J. Antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (beta vulgaris) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens. *LWT Food Sci. Technol.* **2017**, *82*, 354–360. [[CrossRef](#)]
27. Gomez-Estaca, J.; Balaguer, M.P.; Lopez-Carballo, G.; Gavara, R.; Hernandez-Munoz, P. Improving antioxidant and antimicrobial properties of curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization. *Food Hydrocoll.* **2017**, *70*, 313–320. [[CrossRef](#)]
28. Sanchez-Roque, Y.; Ayora-Talavera, G.; Rincon-Rosales, R.; Gutierrez-Miceli, F.A.; Meza-Gordillo, R.; Winkler, R.; Gamboa-Becerra, R.; Ayora-Talavera, T.D.; Ruiz-Valdiviezo, V.M. The flavonoid fraction from rhoeo discolor leaves acting as antiviral against influenza a virus. *Rec. Nat. Prod.* **2017**, *11*, 532–546. [[CrossRef](#)]
29. Vazquez-Calvo, A.; de Oya, N.J.; Martin-Acebes, M.A.; Garcia-Moruno, E.; Saiz, J.C. Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the flaviviruses west nile virus, zika virus, and dengue virus. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S–217S. [[PubMed](#)]
31. Lindsay, D.G.; Astley, S.B. European research on the functional effects of dietary antioxidants—EUROPEDA. *Mol. Asp. Med.* **2002**, *23*, 1–38. [[CrossRef](#)]
32. Bhattarai, G.; Poudel, S.B.; Kook, S.H.; Lee, J.C. Anti-inflammatory, anti-osteoclastic, and antioxidant activities of genistein protect against alveolar bone loss and periodontal tissue degradation in a mouse model of periodontitis. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 2510–2521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dehkharghanian, M.; Lacroix, M.; Vijayalakshmi, M.A. Antioxidant properties of green tea polyphenols encapsulated in caseinate beads. *Dairy Sci. Technol.* **2009**, *89*, 485–499. [[CrossRef](#)]
34. Dairi, S.; Carboneau, M.A.; Galeano-Diaz, T.; Remini, H.; Dahmoune, F.; Aoun, O.; Belbahi, A.; Lauret, C.; Cristol, J.P.; Madani, K. Antioxidant effects of extra virgin olive oil enriched by myrtle phenolic extracts on iron-mediated lipid peroxidation under intestinal conditions model. *Food Chem.* **2017**, *237*, 297–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ursache, F.M.; Ghinea, I.O.; Turturica, M.; Aprodu, I.; Rapeanu, G.; Stanciuc, N. Phytochemicals content and antioxidant properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as affected by heat treatment—Quantitative spectroscopic and kinetic approaches. *Food Chem.* **2017**, *233*, 442–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lambert, J.D.; Hong, J.; Yang, G.Y.; Liao, J.; Yang, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 284S–291S. [[PubMed](#)]
37. Duluc, L.; Jacques, C.; Soleti, R.; Iacobazzi, F.; Simard, G.; Andriantsitohaina, R. Modulation of mitochondrial capacity and angiogenesis by red wine polyphenols via estrogen receptor, NADPH oxidase and nitric oxide synthase pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 783–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Khan, N.; Mukhtar, H. Modulation of signaling pathways in prostate cancer by green tea polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 667–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nunes, C.; Teixeira, N.; Serra, D.; Freitas, V.; Almeida, L.; Laranjinha, J. Red wine polyphenol extract efficiently protects intestinal epithelial cells from inflammation via opposite modulation of JAK/STAT and Nrf2 pathways. *Toxicol. Res.* **2016**, *5*, 53–65. [[CrossRef](#)]

40. Scapagnini, G.; Vasto, S.; Abraham, N.G.; Caruso, C.; Zella, D.; Galvano, F. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: A nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* **2011**, *44*, 192–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Joven, J.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Alonso-Villaverde, C.; Menendez, J.A. Bioactive Food Components Platform. Polyphenols and the modulation of gene expression pathways: Can we eat our way out of the danger of chronic disease? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 985–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jayasena, T.; Poljak, A.; Smythe, G.; Braidy, N.; Muench, G.; Sachdev, P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 867–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sloczynska, K.; Powroznik, B.; Pekala, E.; Waszkielewicz, A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J. Appl. Genet.* **2014**, *55*, 273–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rodeiro, I.; Donato, M.T.; Jimenez, N.; Garrido, G.; Molina-Torres, J.; Menendez, R.; Castell, J.V.; Gomez-Lechon, M.J. Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 279–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Munday, R.; Munday, C.M. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: Comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1867–1871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lu, F.; Zahid, M.; Wang, C.; Saeed, M.; Cavalieri, E.L.; Rogan, E.G. Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells. *Cancer Prev. Res.* **2008**, *1*, 135–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pérez-Sánchez, A.; Barrajón-Catalán, E.; Herranz-López, M.; Castillo, J.; Micol, V. Lemon balm extract (*Melissa officinalis* L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. *J. Dermatol. Sci.* **2016**, *84*, 169–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Grosso, G.; Godos, J.; Lamuela-Raventos, R.; Ray, S.; Micek, A.; Pajak, A.; Sciacca, S.; D'Orazio, N.; Del Rio, D.; Galvano, F. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Grosso, G.; Micek, A.; Godos, J.; Pajak, A.; Sciacca, S.; Galvano, F.; Giovannucci, E.L. Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in prospective cohort studies: Systematic review and dose-response meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* **2017**, *185*, 1304–1316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kale, A.; Gawande, S.; Kotwal, S.; Netke, S.; Roomi, M.W.; Ivanov, V.; Niedzwecki, A.; Rath, M. A combination of green tea extract, specific nutrient mixture and quercetin: An effective intervention treatment for the regression of N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced mammary tumors in Wistar rats. *Oncol. Lett.* **2010**, *1*, 313–317. [[PubMed](#)]
51. Venkatesan, T.; Choi, Y.W.; Mun, S.P.; Kim, Y.K. Pinus radiata bark extract induces caspase-independent apoptosis-like cell death in MCF-7 human breast cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* **2016**, *32*, 451–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chang, C.H.; Ou, T.T.; Yang, M.Y.; Huang, C.C.; Wang, C.J. Nelumbo nucifera gaertn leaves extract inhibits the angiogenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulation connective tissue growth factor (CTGF) mediated PI3K/AKT/ERK signaling. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *188*, 111–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Studzinska-Sroka, E.; Piotrowska, H.; Kucinska, M.; Murias, M.; Bylka, W. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from hypogymnia physodes against breast cancer cell lines. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 2480–2485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sharma, K.; Pachauri, S.D.; Khandelwal, K.; Ahmad, H.; Arya, A.; Biala, P.; Agrawal, S.; Pandey, R.R.; Srivastava, A.; Srivastav, A.; et al. Anticancer effects of extracts from the fruit of morinda citrifolia (noni) in breast cancer cell lines. *Drug Res.* **2016**, *66*, 141–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bouallagui, Z.; Han, J.; Isoda, H.; Sayadi, S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 179–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Fogli, S.; Arena, C.; Carpi, S.; Polini, B.; Bertini, S.; Digiacomio, M.; Gado, F.; Saba, A.; Saccomanni, G.; Breschi, M.C.; et al. Cytotoxic activity of oleocanthal isolated from virgin olive oil on human melanoma cells. *Nutr. Cancer Int. J.* **2016**, *68*, 873–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Goldsmith, C.D.; Vuong, Q.V.; Sadeqzadeh, E.; Stathopoulos, C.E.; Roach, P.D.; Scarlett, C.J. Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. Leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules* **2015**, *20*, 12992–13004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Barrajon-Catalan, E.; Taamalli, A.; Quirantes-Pine, R.; Roldan-Segura, C.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Micol, V.; Zarrouk, M. Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *105*, 156–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Dai, X.F.; Li, T.; Bai, Z.H.; Yang, Y.K.; Liu, X.X.; Zhan, J.L.; Shi, B.Z. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 2929–2943. [[PubMed](#)]
60. Rakha, E.A.; Reis, J.S.; Ellis, I.O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *120*, 293–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Sotiriou, C.; Pusztai, L. Molecular origins of cancer gene-expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 790–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Alluri, P.G.; Speers, C.; Chinnaiyan, A.M. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* **2014**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Mc Cormack, O.; Harrison, M.; Kerin, M.J.; McCann, A. Role of the progesterone receptor (PR) and the PR isoforms in breast cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **2007**, *13*, 283–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R. The HER2 receptor in breast cancer: Pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, *2012*, 743193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Luporsi, E.; André, F.; Spyrtatos, F.; Martin, P.-M.; Jacquemier, J.; Penault-Llorca, F.; Tubiana-Mathieu, N.; Sigal-Zafrani, B.; Arnould, L.; Gompel, A.; et al. Ki-67: Level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: Analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *132*, 895–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Oakman, C.; Bessi, S.; Zafarana, E.; Galardi, F.; Biganzoli, L.; Di Leo, A. Recent advances in systemic therapy. New diagnostics and biological predictors of outcome in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2009**, *11*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Brenton, J.D.; Carey, L.A.; Ahmed, A.A.; Caldas, C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 7350–7360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Parker, J.S.; Mullins, M.; Cheang, M.C.U.; Leung, S.; Voduc, D.; Vickery, T.; Davies, S.; Fauron, C.; He, X.P.; Hu, Z.Y.; et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1160–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Lal, S.; McCart Reed, A.E.; de Luca, X.M.; Simpson, P.T. Molecular signatures in breast cancer. *Methods* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Fan, C.; Oh, D.S.; Wessels, L.; Weigelt, B.; Nuyten, D.S.A.; Nobel, A.B.; van't Veer, L.J.; Perou, C.M. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 560–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Voduc, K.D.; Cheang, M.C.U.; Tyllesley, S.; Gelmon, K.; Nielsen, T.O.; Kennecke, H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1684–1691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Howlader, N.; Altekruse, S.F.; Li, C.I.; Chen, V.W.; Clarke, C.A.; Ries, L.A.G.; Cronin, K.A. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Arvold, N.D.; Taghian, A.G.; Niemierko, A.; Raad, R.F.A.; Sreedhara, M.; Nguyen, P.L.; Bellon, J.R.; Wong, J.S.; Smith, B.L.; Harris, J.R. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 3885–3891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Haque, R.; Ahmed, S.A.; Inzhakova, G.; Shi, J.X.; Avila, C.; Polikoff, J.; Bernstein, L.; Enger, S.M.; Press, M.F. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: An analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2012**, *21*, 1848–1855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Metzger, O.; Sun, Z.X.; Viale, G.; Price, K.N.; Crivellari, D.; Snyder, R.D.; Gelber, R.D.; Castiglione-Gertsch, M.; Coates, A.S.; Goldhirsch, A.; et al. Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: Results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3083–3090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Sorlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lund, M.J.; Butler, E.N.; Hair, B.Y.; Ward, K.C.; Andrews, J.H.; Oprea-Ilie, G.; Bayakly, A.R.; O'Regan, R.M.; Vertino, P.M.; Eley, J.W. Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes a population-based study and first report. *Cancer* **2010**, *116*, 2549–2559. [[PubMed](#)]
78. Koboldt, D.C.; Fulton, R.S.; McLellan, M.D.; Schmidt, H.; Kalicki-Veizer, J.; McMichael, J.F.; Fulton, L.L.; Dooling, D.J.; Ding, L.; Mardis, E.R.; et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2012**, *490*, 61–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Zong, Y.; Zhu, L.; Wu, J.; Chen, X.; Huang, O.; Fei, X.; He, J.; Chen, W.; Li, Y.; Shen, K. Progesterone receptor status and Ki-67 index may predict early relapse in luminal B/HER2 negative breast cancer patients: A retrospective study. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Samavat, H.; Kurzer, M.S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 231–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Tang, Y.; Wang, Y.; Kiani, M.F.; Wang, B. Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **2016**, *16*, 335–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Yang, X.R.; Chang-Claude, J.; Goode, E.L.; Couch, F.J.; Nevanlinna, H.; Milne, R.L.; Gaudet, M.; Schmidt, M.K.; Broeks, A.; Cox, A.; et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: A pooled analysis from the breast cancer association consortium studies. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 250–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Atchley, D.P.; Albarracin, C.T.; Lopez, A.; Valero, V.; Amos, C.I.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hortobagyi, G.N.; Arun, B.K. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4282–4288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Poljsak, B.; Fink, R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Delfino, R.J.; Staimer, N.; Vaziri, N.D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. *Air Qual. Atmos. Health* **2011**, *4*, 37–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Azzam, E.I.; Jay-Gerin, J.-P.; Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 48–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Handy, D.E.; Loscalzo, J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 1323–1367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Aon, M.A.; Cortassa, S.; O'Rourke, B. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 865–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Mencalha, A.; Victorino, V.J.; Cecchini, R.; Panis, C. Mapping oxidative changes in breast cancer: Understanding the basic to reach the clinics. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1127–1140. [[PubMed](#)]
90. Jezierska-Drutel, A.; Rosenzweig, S.A.; Neumann, C.A. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Adv. Cancer Res.* **2013**, *119*, 107–125. [[PubMed](#)]
91. Gorrini, C.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Hecht, F.; Pessoa, C.F.; Gentile, L.B.; Rosenthal, D.; Carvalho, D.P.; Fortunato, R.S. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 4281–4291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kupsco, A.; Schlenk, D. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2015**, *317*, 1–66. [[PubMed](#)]
94. Navarro-Yepes, J.; Burns, M.; Anandhan, A.; Khalimonchuk, O.; del Razo, L.M.; Quintanilla-Vega, B.; Pappa, A.; Panayiotidis, M.I.; Franco, R. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: Cell death versus survival. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 66–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Samoylenko, A.; Al Hossain, J.; Mennerich, D.; Kellokumpu, S.; Hiltunen, J.K.; Kietzmann, T. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: From mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 2157–2196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Forman, H.J.; Davies, K.J.A.; Ursini, F. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *66*, 24–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



97. Khan, N.; Afaq, F.; Mukhtar, H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: Progress and promise. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 475–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Stoner, G.D.; Mukhtar, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1995**, *22*, 169–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Mileo, A.M.; Miccadei, S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: New therapeutic strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Vance, T.M.; Su, J.; Fontham, E.T.H.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Dietary antioxidants and prostate cancer: A review. *Nutr. Cancer Int. J.* **2013**, *65*, 793–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Kim, Y.; Keogh, J.B.; Clifton, P.M. Polyphenols and glycemic control. *Nutrients* **2016**, *8*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Ge, Q.; Chen, L.; Chen, K. Treatment of diabetes mellitus using ips cells and spice polyphenols. *J. Diabetes Res.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Khan, N.; Khymenets, O.; Urpi-Sarda, M.; Tulipani, S.; Garcia-Aloy, M.; Monagas, M.; Mora-Cubillos, X.; Llorach, R.; Andres-Lacueva, C. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients* **2014**, *6*, 844–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Hernaez, A.; Remaley, A.T.; Farras, M.; Fernandez-Castillejo, S.; Subirana, I.; Schroeder, H.; Fernandez-Mampel, M.; Munoz-Aguayo, D.; Sampson, M.; Sola, R.; et al. Olive oil polyphenols decrease LDL concentrations and LDL atherogenicity in men in a randomized controlled trial. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1692–1697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Elbling, L.; Weiss, R.M.; Teufelhofer, O.; Uhl, M.; Knasmueller, S.; Schulte-Hermann, R.; Berger, W.; Mickshe, M. Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* **2005**, *19*, 807–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Hadi, S.M.; Bhat, S.H.; Azmi, A.S.; Hanif, S.; Shamim, U.; Ullah, M.F. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Semin. Cancer Biol.* **2007**, *17*, 370–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Decker, E.A. Phenolics: Prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.* **1997**, *55*, 396–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Li, Y.; Trush, M.A. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1895s–1898s. [[PubMed](#)]
109. Denoyer, D.; Masaldan, S.; La Fontaine, S.; Cater, M.A. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper that cancer’. *Metallomics* **2015**, *7*, 1459–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Khan, H.Y.; Zubair, H.; Faisal, M.; Ullah, M.F.; Farhan, M.; Sarkar, F.H.; Ahmad, A.; Hadi, S.M. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 437–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Bower, J.J.; Vance, L.D.; Psioda, M.; Smith-Roe, S.L.; Simpson, D.A.; Ibrahim, J.G.; Hoadley, K.A.; Perou, C.M.; Kaufmann, W.K. Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *NPJ Breast Cancer* **2017**, *3*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Oikonomou, C.; Cross, F.R. Rising cyclin-CDK levels order cell cycle events. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Duronio, R.J.; Xiong, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Shin, S.Y.; Yoon, H.; Ahn, S.; Kim, D.-W.; Bae, D.-H.; Koh, D.; Lee, Y.H.; Lim, Y. Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at G1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 16970–16985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Zhao, Q.; Huo, X.-C.; Sun, F.-D.; Dong, R.-Q. Polyphenol-rich extract of salvia chinensis exhibits anticancer activity in different cancer cell lines, and induces cell cycle arrest at the G(0)/G(1)-phase, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 4843–4850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Gonzalez-Sarrias, A.; Ma, H.; Edmonds, M.E.; Seeram, N.P. Maple polyphenols, ginnalins A-C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. *Food Chem.* **2013**, *136*, 636–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

118. Liu, S.-M.; Ou, S.-Y.; Huang, H.-H. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2017**, *18*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Li, T.; Zhu, J.; Guo, L.; Shi, X.; Liu, Y.; Yang, X. Differential effects of polyphenols-enriched extracts from hawthorn fruit peels and fleshes on cell cycle and apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Food Chem.* **2013**, *141*, 1008–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Chen, H.-S.; Bai, M.-H.; Zhang, T.; Li, G.-D.; Liu, M. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-beta/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1730–1738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Nagasaka, A.; Kawane, K.; Yoshida, H.; Nagata, S. Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 931–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Burgess, D.J. Apoptosis refined and lethal. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Miyashita, T.; Krajewski, S.; Krajewska, M.; Wang, H.G.; Lin, H.K.; Liebermann, D.A.; Hoffman, B.; Reed, J.C. Tumor-suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene-expression in vitro in vitro and in vivo in vivo. *Oncogene* **1994**, *9*, 1799–1805. [[PubMed](#)]
125. Muller, P.A.J.; Vousden, K.H. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 304–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Jahanafrooz, Z.; Motameh, N.; Bakhshandeh, B. Comparative evaluation of silibinin effects on cell cycling and apoptosis in human breast cancer MCF-7 and T47D cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2016**, *17*, 2661–2665. [[PubMed](#)]
127. Song, M.S.; Salmena, L.; Pandolfi, P.P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 283–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Gartel, A.L.; Tyner, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 639–649. [[PubMed](#)]
129. D'Angelo, S.; Martino, E.; Ilisso, C.P.; Bagarolo, M.L.; Porcelli, M.; Cacciapuoti, G. Pro-oxidant and pro-apoptotic activity of polyphenol extract from annurca apple and its underlying mechanisms in human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 939–948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Kello, M.; Kulikova, L.; Vaskova, J.; Nagyova, A.; Mojzis, J. Fruit peel polyphenolic extract-induced apoptosis in human breast cancer cells is associated with ros production and modulation of p38MAPK/ERK1/2 and the akt signaling pathway. *Nutr. Cancer* **2017**, *69*, 920–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Hassan, Z.K.; Elamin, M.H.; Omer, S.A.; Daghestani, M.H.; Al-Olayan, E.S.; Elobeid, M.A.; Virk, P. Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 6739–6742. [[CrossRef](#)]
132. Yan, C.-M.; Chai, E.-Q.; Cai, H.-Y.; Miao, G.-Y.; Ma, W. Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 4617–4624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Meeran, S.M.; Patel, S.N.; Chan, T.H.; Tollefsbol, T.O. A novel prodrug of epigallocatechin-3-gallate: Differential epigenetic hTERT repression in human breast cancer cells. *Cancer Prev. Res.* **2011**, *4*, 1243–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Jaiswal, P.K.; Goel, A.; Mittal, R.D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J. Med. Res.* **2015**, *141*, 389–397. [[PubMed](#)]
135. Chen, X.; Li, Y.; Lin, Q.; Wang, Y.; Sun, H.; Wang, J.; Cui, G.; Cai, L.; Dong, X. Tea polyphenols induced apoptosis of breast cancer cells by suppressing the expression of Survivin. *Sci. Rep.* **2014**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Thangapazham, R.L.; Passi, N.; Maheshwari, R.K. Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1938–1943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Mileo, A.M.; Di Venere, D.; Linsalata, V.; Fraioli, R.; Miccadei, S. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3301–3309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

138. Mileo, A.M.; Di Venere, D.; Abbruzzese, C.; Miccadei, S. Long term exposure to polyphenols of artichoke (*Cynara scolymus* L.) exerts induction of senescence driven growth arrest in the MDA-MB231 human breast cancer cell line. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Venkatadri, R.; Muni, T.; Iyer, A.K.V.; Yakisich, J.S.; Azad, N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Srivastava, S.; Somasagara, R.R.; Hegde, M.; Nishana, M.; Tadi, S.K.; Srivastava, M.; Choudhary, B.; Raghavan, S.C. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Afsar, T.; Trembley, J.H.; Salomon, C.E.; Razak, S.; Khan, M.R.; Ahmed, K. Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: Involvement of multiple signal transduction pathways. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Castillo-Pichardo, L.; Dharmawardhane, S.F. Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of gefitinib in breast cancer. *Nutr. Cancer Int. J.* **2012**, *64*, 1058–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Galluzzi, L.; Pietrocola, F.; Bravo-San Pedro, J.M.; Amaravadi, R.K.; Baehrecke, E.H.; Cecconi, F.; Codogno, P.; Debnath, J.; Gewirtz, D.A.; Karantza, V.; et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* **2015**, *34*, 856–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Villar, V.H.; Merhi, F.; Djavaheri-Mergny, M.; Duran, R.V. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy* **2015**, *11*, 1198–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Mah, L.Y.; Ryan, K.M. Autophagy and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Yang, Y.; Coleman, M.; Zhang, L.; Zheng, X.; Yue, Z. Autophagy in axonal and dendritic degeneration. *Trends Neurosci.* **2013**, *36*, 418–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Plaza-Zabala, A.; Sierra-Torres, V.; Sierra, A. Autophagy and microglia: Novel partners in neurodegeneration and aging. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Xilouri, M.; Stefanis, L. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res. Rev.* **2016**, *32*, 13–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Chauhan, S.; Mandell, M.A.; Deretic, V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 507–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Chiu, H.-C.; Soni, S.; Kulp, S.K.; Curry, H.; Wang, D.; Gunn, J.S.; Schlesinger, L.S.; Chen, C.-S. Eradication of intracellular francisella tularensis in THP-1 human macrophages with a novel autophagy inducing agent. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Hasima, N.; Ozpolat, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Mathew, R.; Karantza-Wadsworth, V.; White, E. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 961–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Huang, H.-C.; Syu, K.-Y.; Lin, J.-K. Chemical composition of solanum nigrum linn extract and induction of autophagy by leaf water extract and its major flavonoids in AU565 breast cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8699–8708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Adams, L.S.; Phung, S.; Yee, N.; Seeram, N.P.; Li, L.; Chen, S. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 3594–3605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Sun, T.; Chen, Q.Y.; Wu, L.J.; Yao, X.M.; Sun, X.J. Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 3462–3467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Nemeč, M.J.; Kim, H.; Marcianti, A.B.; Barnes, R.C.; Hendrick, E.D.; Bisson, W.H.; Talcott, S.T.; Mertens-Talcott, S.U. Polyphenolics from mango (*Mangifera indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation through activation of AMPK pathway and suppression of mTOR in athymic nude mice. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *41*, 12–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 77–88. [[PubMed](#)]
158. Scarlatti, F.; Maffei, R.; Beau, I.; Codogno, P.; Ghidoni, R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1318–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

159. Zhang, L.; Shamaladevi, N.; Jayaprakasha, G.K.; Patil, B.S.; Lokeshwar, B.L. Polyphenol-rich extract of pimenta dioica berries (allspice) kills breast cancer cells by autophagy and delays growth of triple negative breast cancer in athymic mice. *Oncotarget* **2015**, *6*, 16379–16395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Al Dhaheri, Y.; Attoub, S.; Ramadan, G.; Arafat, K.; Bajbouj, K.; Karuvantevida, N.; AbuQamar, S.; Eid, A.; Iratni, R. Carnosol induces ROS-mediated Beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Fu, Y.; Chang, H.; Peng, X.; Bai, Q.; Yi, L.; Zhou, Y.; Zhu, J.; Mi, M. Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
162. Samadi, A.K.; Bilsland, A.; Georgakilas, A.G.; Amedei, A.; Amin, A.; Bishayee, A.; Azmi, A.S.; Lokeshwar, B.L.; Grue, B.; Panis, C.; et al. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, S151–S184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Thompson, P.A.; Khatami, M.; Bagloli, C.J.; Sun, J.; Harris, S.; Moon, E.-Y.; Al-Mulla, F.; Al-Temaimi, R.; Brown, D.; Colacci, A.; et al. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, S232–S253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Demaria, S.; Pikarsky, E.; Karin, M.; Coussens, L.M.; Chen, Y.-C.; El-Omar, E.M.; Trinchieri, G.; Dubinett, S.M.; Mao, J.T.; Szabo, E.; et al. Cancer and inflammation: Promise for biologic therapy. *J. Immunother.* **2010**, *33*, 335–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Pinho, A.V.; Chantrill, L.; Rooman, I. Chronic pancreatitis: A path to pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **2014**, *345*, 203–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Higashi, D.; Futami, K.; Kojima, D.; Futatsuki, R.; Ishibashi, Y.; Maekawa, T.; Yano, Y.; Takatsu, N.; Hirai, F.; Matsui, T.; et al. Cancer of the small intestine in patients with crohn's disease. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 2977–2980. [[PubMed](#)]
167. Tu, T.; Buhler, S.; Bartenschlager, R. Chronic viral hepatitis and its association with liver cancer. *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 817–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Wei, X.L.; Luo, H.Y.; Li, C.F.; Jin, Y.; Zeng, Z.L.; Ju, H.Q.; Wu, Q.N.; Wang, Y.; Mao, M.J.; Liu, W.L.; et al. Hepatitis B virus infection is associated with younger median age at diagnosis and death in cancers. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 152–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Kolb, J.M.; Ozbek, U.; Harpaz, N.; Holcombe, R.F.; Ang, C. Effect of helicobacter pylori infection on outcomes in resected gastric and gastroesophageal junction cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **2017**, *8*, 583–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Lee, Y.C.; Lin, J.T. Screening and treating Helicobacter pylori infection for gastric cancer prevention on the population level. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *32*, 1160–1169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Wang, T.Y.; Cai, H.; Zheng, W.; Michel, A.; Pawlita, M.; Milne, G.; Xiang, Y.B.; Gao, Y.T.; Li, H.L.; Rothman, N.; et al. A prospective study of urinary prostaglandin E2 metabolite, helicobacter pylori antibodies, and gastric cancer risk. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 1380–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Greten, F.R.; Eckmann, L.; Greten, T.F.; Park, J.M.; Li, Z.W.; Egan, L.J.; Kagnoff, M.F.; Karin, M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **2004**, *118*, 285–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Coussens, L.M.; Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *420*, 860–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Meira, L.B.; Bugni, J.M.; Green, S.L.; Lee, C.-W.; Pang, B.; Borenshtein, D.; Rickman, B.H.; Rogers, A.B.; Moroski-Erkul, C.A.; McFaline, J.L.; et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 2516–2525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Benvenuto, M.; Fantini, M.; Masuelli, L.; De Smaele, E.; Zazzeroni, F.; Tresoldi, I.; Calabrese, G.; Galvano, F.; Modesti, A.; Bei, R. Inhibition of ErbB receptors, hedgehog and NF-kappaB signaling by polyphenols in cancer. *Front. Biosci. Landmark* **2013**, *18*, 1291–1311.
176. Ferruelo, A.; de las Heras, M.M.; Redondo, C.; Ramon de Fata, F.; Romero, I.; Angulo, J.C. Wine polyphenols exert antineoplastic effect on androgen resistant PC-3 cell line through the inhibition of the transcriptional activity of COX-2 promoter mediated by NF-k beta. *Actas Urol. Esp.* **2014**, *38*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Willenberg, I.; Meschede, A.K.; Gueler, F.; Jang, M.-S.; Shushakova, N.; Schebb, N.H. Food polyphenols fail to cause a biologically relevant reduction of COX-2 activity. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

178. Lilia Salas, A.; Rosa Alberto, M.; Catiana Zampini, I.; Soledad Cuello, A.; Maldonado, L.; Luis Rios, J.; Schmeda-Hirschmann, G.; Ines Isla, M. Biological activities of polyphenols-enriched propolis from argentina arid regions. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 27–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Yang, F.; Suo, Y.; Chen, D.; Tong, L. Protection against vascular endothelial dysfunction by polyphenols in sea buckthorn berries in rats with hyperlipidemia. *Biosci. Trends* **2016**, *10*, 188–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Surh, Y.-J.; Chun, K.-S.; Cha, H.-H.; Han, S.S.; Keum, Y.-S.; Park, K.-K.; Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kb activation. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2001**, *480–481*, 243–268. [[CrossRef](#)]
181. Rodriguez-Ramiro, I.; Ramos, S.; Lopez-Oliva, E.; Agis-Torres, A.; Bravo, L.; Goya, L.; Angeles Martin, M. Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF-alpha-stimulated Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 206–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Banerjee, N.; Talcott, S.; Safe, S.; Mertens-Talcott, S.U. Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells in vitro and vivo: Potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *136*, 21–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Mandal, A.; Bhatia, D.; Bishayee, A. Anti-inflammatory mechanism involved in pomegranate-mediated prevention of breast cancer: The role of NF-kappab and Nrf2 signaling pathways. *Nutrients* **2017**, *9*, 436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Vuong, T.; Mallet, J.-F.; Ouzounova, M.; Rahbar, S.; Hernandez-Vargas, H.; Herceg, Z.; Matar, C. Role of a polyphenol-enriched preparation on chemoprevention of mammary carcinoma through cancer stem cells and inflammatory pathways modulation. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Kang, H.K.; Choi, Y.-H.; Kwon, H.; Lee, S.-B.; Kim, D.-H.; Sung, C.K.; Park, Y.I.; Dong, M.-S. Estrogenic/antiestrogenic activities of a *Epimedium koreanum* extract and its major components: In vitro and in vivo studies. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 2751–2759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Camargo, M.S.; Prieto, A.M.; Resende, F.A.; Boldrin, P.K.; Cardoso, C.R.P.; Fernandez, M.F.; Molina-Molina, J.M.; Olea, N.; Vilegas, W.; Cuesta-Rubio, O.; et al. Evaluation of estrogenic, antiestrogenic and genotoxic activity of nemorosone, the major compound found in brown Cuban propolis. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Collins-Burow, B.M.; Antoon, J.W.; Frigo, D.E.; Elliott, S.; Weldon, C.B.; Boue, S.M.; Beckman, B.S.; Curiel, T.J.; Alam, J.; McLachlan, J.A.; et al. Antiestrogenic activity of flavonoid phytochemicals mediated via the c-jun N-terminal protein kinase pathway. Cell-type specific regulation of estrogen receptor alpha. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *132*, 186–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Korobkova, E.A. Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: Implications for diseases. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 1359–1390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Yiannakopoulou, E.C. Interaction of green tea catechins with breast cancer endocrine treatment: A systematic review. *Pharmacology* **2014**, *94*, 245–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Way, T.D.; Lee, H.H.; Kao, M.C.; Lin, J.K. Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu-transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 2165–2174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Griffiths, K.; Wilson, D.W.; Singh, R.B.; De Meester, F. Effect of dietary phytoestrogens on human growth regulation: Imprinting in health & disease. *Indian J. Med. Res.* **2014**, *140*, 82–90.
192. Patisaul, H.B.; Jefferson, W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* **2010**, *31*, 400–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Lee, Y.M.; Kim, J.B.; Bae, J.H.; Lee, J.S.; Kim, P.-S.; Jang, H.H.; Kim, H.R. Estrogen-like activity of aqueous extract from agrimonia pilosa ledeb. in MCF-7 cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Patemi, I.; Granchi, C.; Katzenellenbogen, J.A.; Minutolo, F. Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* **2014**, *90*, 13–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Chalopin, M.; Tesse, A.; Martinez, M.C.; Rognan, D.; Amal, J.-F.; Andriantsitohaina, R. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS ONE* **2010**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

196. Albini, A.; Rosano, C.; Angelini, G.; Amaro, A.; Esposito, A.I.; Maramotti, S.; Noonan, D.M.; Pfeffer, U. Exogenous hormonal regulation in breast cancer cells by phytoestrogens and endocrine disruptors. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1129–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Lambrinidis, G.; Halabalaki, M.; Katsanou, E.S.; Skaltsounis, A.L.; Alexis, M.N.; Mikros, E. The estrogen receptor and polyphenols: Molecular simulation studies of their interactions, a review. *Environ. Chem. Lett.* **2006**, *4*, 159–174. [[CrossRef](#)]
198. De Amicis, F.; Russo, A.; Avena, P.; Santoro, M.; Vivacqua, A.; Bonofiglio, D.; Mauro, L.; Aquila, S.; Tramontano, D.; Fuqua, S.A.W.; et al. In vitro mechanism for downregulation of ER-alpha expression by epigallocatechin gallate in ER+/PR+ human breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 840–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Hallman, K.; Aleck, K.; Quigley, M.; Dwyer, B.; Lloyd, V.; Szmyd, M.; Dinda, S. The regulation of steroid receptors by epigallocatechin-3-gallate in breast cancer cells. *Breast Cancer Targets Ther.* **2017**, *9*, 365–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Bak, M.J.; Das Gupta, S.; Wahler, J.; Suh, N. Role of dietary bioactive natural products in estrogen receptor-positive breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *40–41*, 170–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Wang, Y.; Ghossein, W.M.; Chan, F.L.; Chen, S.; Leung, L.K. The red clover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin a inhibits aromatase activity and expression. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 303–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Wang, Y.; Lee, K.W.; Chan, F.L.; Chen, S.A.; Leung, L.K. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 71–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Lan, Y.; Ghossein, W.M.; Chan, F.L.; Chen, S.; Leung, L.K. Dietary administration of the licorice flavonoid isoliquiritigenin deters growth of MCF-7 cells overexpressing aromatase. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 1028–1036. [[CrossRef](#)]
204. Moseley, V.R.; Morris, J.; Knackstedt, R.W.; Wargovich, M.J. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate, contributes to the degradation of DNMT3A and HDAC3 in HCT 116 human colon cancer cells. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 5325–5333. [[PubMed](#)]
205. Kang, I.; Okla, M.; Chung, S. Ellagic acid inhibits adipocyte differentiation through coactivator-associated arginine methyltransferase 1-mediated chromatin modification. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 946–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Fang, M.; Chen, D.; Yang, C.S. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 223S–228S. [[PubMed](#)]
207. Pathiraja, T.N.; Stearns, V.; Oesterreich, S. Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer-role in treatment response. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2010**, *15*, 35–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Meeran, S.M.; Patel, S.N.; Li, Y.; Shukla, S.; Tollefsbol, T.O. Bioactive dietary supplements reactivate ER expression in ER-negative breast cancer cells by active chromatin modifications. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Carpenter, R.L.; Lo, H.-W. Regulation of apoptosis by HER2 in breast cancer. *J. Carcinog. Mutagen.* **2013**, *2013*. [[CrossRef](#)]
210. Zhou, B.H.P.; Liao, Y.; Xia, W.Y.; Zou, Y.Y.; Spohn, B.; Hung, M.C. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 973–982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Siddiqua, A.; Long, L.M.; Li, L.; Marciniak, R.A.; Kazhdan, I. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer* **2008**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Boekhout, A.H.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. Trastuzumab. *Oncologist* **2011**, *16*, 800–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Menendez, J.A.; Vazquez-Martin, A.; Colomer, R.; Brunet, J.; Carrasco-Pancorbo, A.; Garcia-Villalba, R.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* **2007**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Menendez, J.A.; Vazquez-Martin, A.; Garcia-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A. Tabanti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer* **2008**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

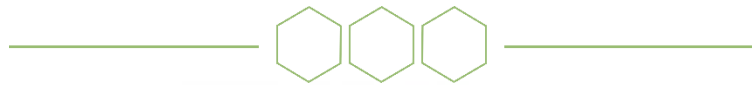
215. Mahmoodi, N.; Motamed, N.; Paylakhi, S.H.; Mahmoodi, N.O. Comparing the effect of silybin and silybin advanced (tm) on viability and HER2 expression on the human breast cancer SKBR3 cell line by no serum starvation. *Iranian J. Pharm. Res.* **2015**, *14*, 521–530.
216. Way, T.D.; Kao, M.C.; Lin, J.K. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4479–4489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Lai, H.-W.; Chien, S.-Y.; Kuo, S.-J.; Tseng, L.-M.; Lin, H.-Y.; Chi, C.-W.; Chen, D.-R. The potential utility of curcumin in the treatment of HER-2-overexpressed breast cancer: An in vitro and in vivo comparison study with herceptin. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2012**. [[CrossRef](#)]
218. Sidera, K.; Gaitanou, M.; Stellas, D.; Matsas, R.; Patsavoudi, E. A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2031–2041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Citri, A.; Harari, D.; Shohat, G.; Ramakrishnan, P.; Gan, J.; Lavi, S.; Eisenstein, M.; Kimchi, A.; Wallach, D.; Pietrokovski, S.; et al. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14361–14369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Garcia-Carbonero, R.; Camero, A.; Paz-Ares, L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: Moving into the clinic. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, E358–E369. [[CrossRef](#)]
221. Yan, Y.-Y.; Zheng, L.-S.; Zhang, X.; Chen, L.-K.; Singh, S.; Wang, F.; Zhang, J.-Y.; Liang, Y.-J.; Dai, C.-L.; Gu, L.-Q.; et al. Blockade of HER2/neu binding to HSP90 by emodin azide methyl anthraquinone derivative induces proteasomal degradation of HER2/neu. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 1687–1697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Chiang, C.-T.; Way, T.-D.; Lin, J.-K. Sensitizing HER2-overexpressing cancer cells to luteolin-induced apoptosis through suppressing p21(WAF1/CLP1) expression with rapamycin. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2127–2138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Vassallo, A.; Vaccaro, M.C.; De Tommasi, N.; Dal Piaz, F.; Leone, A. Identification of the plant compound geraniin as a novel Hsp90 inhibitor. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Giommarelli, C.; Zuco, V.; Favini, E.; Pisano, C.; Dal Piaz, F.; De Tommasi, N.; Zunino, F. The enhancement of antiproliferative and proapoptotic activity of HDAC inhibitors by curcumin is mediated by Hsp90 inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 995–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Moses, M.A.; Henry, E.C.; Ricke, W.A.; Gasiewicz, T.A. The heat shock protein 90 inhibitor, (–)-epigallocatechin gallate, has anticancer activity in a novel human prostate cancer progression model. *Cancer Prev. Res.* **2015**, *8*, 249–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Menendez, J.A.; Lupu, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 763–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Yoon, S.; Lee, M.-Y.; Park, S.W.; Moon, J.-S.; Koh, Y.-K.; Ahn, Y.-H.; Park, B.-W.; Kim, K.-S. Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26122–26131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Pizer, E.S.; Thupari, J.; Han, W.F.; Pinn, M.L.; Chrest, F.J.; Frehywot, G.L.; Townsend, C.A.; Kuhajda, F.P. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenograft. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 213–218. [[PubMed](#)]
229. Zhou, W.; Tu, Y.; Simpson, P.J.; Kuhajda, F.P. Malonyl-CoA decarboxylase inhibition is selectively cytotoxic to human breast cancer cells. *Oncogene* **2009**, *28*, 2979–2987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Thupari, J.N.; Pinn, M.L.; Kuhajda, F.P. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 217–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Younesian, O.; Kazerouni, F.; Dehghan-Nayeri, N.; Omrani, D.; Rahimpour, A.; Shanaki, M.; Kalkhoran, M.R.; Cheshmi, F. Effect of curcumin on fatty acid synthase expression and enzyme activity in breast cancer cell line SKBR3. *Iranian J. Cancer Prev.* **2017**, *10*. [[CrossRef](#)]
232. Menendez, J.A.; Vazquez-Martin, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Garcia-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A. Analyzing effects of extra-virgin olive polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 433–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

233. Oliveras, G.; Blancafort, A.; Urruticoechea, A.; Campuzano, O.; Gómez-Cabello, D.; Brugada, R.; López-Rodríguez, M.L.; Colomer, R.; Puig, T. Novel anti-fatty acid synthase compounds with anti-cancer activity in HER2<sup>+</sup> breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1210*, 86–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Rein, M.J.; Renouf, M.; Cruz-Hernandez, C.; Actis-Goretti, L.; Thakkar, S.K.; da Silva Pinto, M. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75*, 588–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Gao, S.; Hu, M. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 550–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Watkins, R.; Wu, L.; Zhang, C.; Davis, R.M.; Xu, B. Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 6055–6074.
237. Davidov-Pardo, G.; McClements, D.J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*, 88–103. [[CrossRef](#)]
238. Seguin, J.; Brullé, L.; Boyer, R.; Lu, Y.M.; Ramos Romano, M.; Touil, Y.S.; Scherman, D.; Bessodes, M.; Mignet, N.; Chabot, G.G. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444*, 146–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Shaikh, J.; Ankola, D.D.; Beniwal, V.; Singh, D.; Kumar, M.N.V.R. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *37*, 223–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Paudel, A.; Worku, Z.A.; Meeus, J.; Guns, S.; Van den Mooter, G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 253–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Aggarwal, B.B.; Kumar, A.; Bharti, A.C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 363–398. [[PubMed](#)]
242. Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev. Res.* **2009**, *2*, 409–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Ho, C.K.; Choi, S.W.; Fung, M.S.; Benzie, I.F.F. Tea polyphenols: Absorption, bioavailability and potential toxicity. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)]
244. Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P.W.; Tang, Y. Admetsar: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical admet properties. *J. Chem. Inform. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. Datawarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inform. Model.* **2015**, *55*, 460–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Spratlin, J.L.; Serkova, N.J.; Eckhardt, S.G. Clinical applications of metabolomics in oncology: A review. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 431–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Zhang, X.; Yap, Y.; Wei, D.; Chen, G.; Chen, F. Novel omics technologies in nutrition research. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 169–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Del Rio, A.; Da Costa, F.B. Molecular approaches to explore natural and food-compound modulators in cancer epigenetics and metabolism. In *Foodinformatics: Applications of Chemical Information to Food Chemistry*; Springer International Publishing: Gewerbestrasse, Switzerland, 2014; pp. 131–149.
249. Saeed, M.; Kadioglu, O.; Khalid, H.; Sugimoto, Y.; Efferth, T. Activity of the dietary flavonoid, apigenin, against multidrug-resistant tumor cells as determined by pharmacogenomics and molecular docking. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 44–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Paluszczak, J.; Krajka-Kuźniak, V.; Baer-Dubowska, W. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192*, 119–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Vanden Berghe, W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 565–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

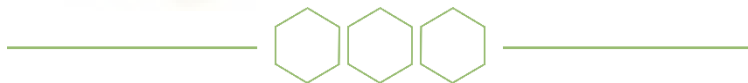


© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).








## **Otros artículos científicos**





Review

# The Multitarget Activity of Natural Extracts on Cancer: Synergy and Xenohormesis

María Herranz-López , María Losada-Echeberriá  and Enrique Barrajón-Catalán \* 

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) and Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIbE), Universitat Miguel Hernández 03202 Elche, Spain; mherranz@umh.es (M.H.-L.); mlosada@umh.es (M.L.-E.)

\* Correspondence: e.barrajon@umh.es; Tel.: +34-965-222-586

Received: 30 November 2018; Accepted: 24 December 2018; Published: 28 December 2018



**Abstract:** It is estimated that over 60% of the approved drugs and new drug developments for cancer and infectious diseases are from natural origin. The use of natural compounds as a potential source of antitumor agents has been deeply studied in many cancer models, both in vitro and in vivo. Most of the Western medicine studies are based on the use of highly selective pure compounds with strong specificity for their targets such as colchicine or taxol. Nevertheless, approximately 60% of fairly specific drugs in their initial research fail because of toxicity or ineffectiveness in late-stage preclinical studies. Moreover, cancer is a multifaceted disease that in most cases deserves a polypharmacological therapeutic approach. Complex plant-derived mixtures such as natural extracts are difficult to characterize and hardly exhibit high pharmacological potency. However, in some cases, these may provide an advantage due to their multitargeted mode of action and potential synergistic behavior. The polypharmacology approach appears to be a plausible explanation for the multitargeted mechanism of complex natural extracts on different proteins within the same signalling pathway and in several biochemical pathways at once. This review focuses on the different aspects of natural extracts in the context of anticancer activity drug development, with special attention to synergy studies and xenohormesis.

**Keywords:** cancer; natural compound; synergy; xenohormesis; polypharmacology

## 1. Introduction

Cancer is not a single disease, but a complex clinical situation in which multiple molecular pathways and cellular processes are compromised. Each cancer type has its own molecular fingerprint and, at least one of the cancer hallmarks described in [1], is altered. However, in spite of this heterogeneous situation, all cancers have a common behavior based on uncontrolled proliferation and invasion. This invasive phenotype is the real clinical problem and, in most cases, still remains unresolved, causing morbidity and mortality.

Anticancer research and drug discovery are continuously increasing the therapeutic arsenal, and relevant advances have been made towards individualized treatments [2–5]. New antibody-based drugs, called biological treatments [6,7], have improved treatments and prognosis in some cancer types such as breast, lung, liver cancers and lymphoma. New specific inhibitor families have also been developed, especially against proliferation related kinases. These drugs are called “inibs” [8,9]. In this sense, there is a tendency to look for highly specific drugs within the low micromolar range to solve very specific, almost individual cases. In vitro and in silico approaches have propelled the development of these specific drugs, and our bibliography is full of these examples [10–13]. These specific drugs follow the classic pharmacological dogma “one drug-one target”, but in spite of their undeniable value, they lack some relevant aspects that will be discussed in the following sections.

On the contrary, the molecular promiscuity of some molecules, especially those from natural origin [14,15], allow them to exert a potential multitarget mechanism of action. These compounds are able to interact with different targets, modifying different pathways or different steps of the same signaling cascade. In addition, promiscuity is not always due to a single compound but a mixture of compounds, as occurs in some complex natural extracts. In these cases, each compound is able to interact with one or multiple targets, increasing the pharmacological promiscuity of the whole drug. In addition, natural extracts or their main components can be combined with conventional chemotherapy, reducing the development of resistance to antitumor drugs and toxic effects [16].

This review will be focused on discussing the advantages and drawbacks of the use of natural extracts when compared with classical individual targeting strategy. Xenohormesis, multitargeting, synergy and drug resistance will be the main points that will be addressed.

## 2. Natural Compounds, Hormesis and Xenohormesis

Chemistry and analytical advances have allowed the synthesis and characterization of millions of new molecules for drug discovery. In some cases, synthesis was structurally guided using *in silico* or structural approaches, in others, combinatorial libraries were built based on a molecular scaffold or leads. This approach has allowed the development of new drugs not only for cancer treatment but also for other diseases. However, all these drugs have been human-designed and lack natural origin. On the contrary, natural extracts and their compounds have been selected for by millions of years of evolution as complex sources of medicinal agents. This is the basis of xenohormesis hypothesis [17,18]. They present very diverse chemical structures, from the simplest phenolic acids in plants to the most complex marine compounds [19–21]. Glycosylation, methylation and other esterifications and the presence of other moieties, increase the number and diversity of natural compounds. This constitutes a countless and invaluable source of new drugs. From a biomedical point of view, hormesis is an adaptive response in which the exposure to a low dose of an environmental factor or chemical compound, that is harmful at high concentrations, has a beneficial and/or adaptive effect on a cell or organism. Sometimes this response is mediated by some compounds that, when incorporated in the heterotroph diet, induce biological responses leading to pharmacological effects. This final effect is called xenohormesis, as the final benefit is obtained by the heterotroph organism, not for the plant that originally adapted to the stressful condition [17,18]. Xenohormesis is a way of cross-species interaction and communication.

Although hormesis is an essential concept in evolution, xenohormesis has also allowed the expansion and fixation of evolutionary advances in non-autotrophs organisms. Nowadays, xenohormesis gives us a chance to obtain benefits from natural compounds and obtain new drugs selected by nature all through the evolution process. These compounds can be used directly for anticancer drug discovery, and also as new leads in novel developments using the classical structurally guided or *in silico* approaches. This is one of the main advantages of natural extracts and their compounds. They can be used as any other drugs, but with the benefit of being selected by natural evolution.

## 3. Combined Therapies, Multitargeting and Synergy

Based on the classic pharmacological dogma “one drug-one target”, monotherapy has been the traditional approach, not only to treat diseases, but also to find new active drugs against a chosen target. However, presently there is evidence pointing out that combined therapies are much more efficient than single-drug-based treatments. In this sense, combinational therapy is extended to treat not only cancer but also other diseases, such as AIDS, bacterial infections, hypertension, metabolic or rheumatic disorders [22].

Combined drug therapy design is a hard and challenging task. Individual and combined actions must be characterized and it sometimes requires new preclinical and clinical trials. In addition, these multiple comparisons are sometimes difficult to incorporate into those studies.

Combined therapies are normally based on co-administration of two or more drugs. These combined drugs can be based on the combination of pure compounds, or can be achieved by using drugs based on mixtures of natural extracts.

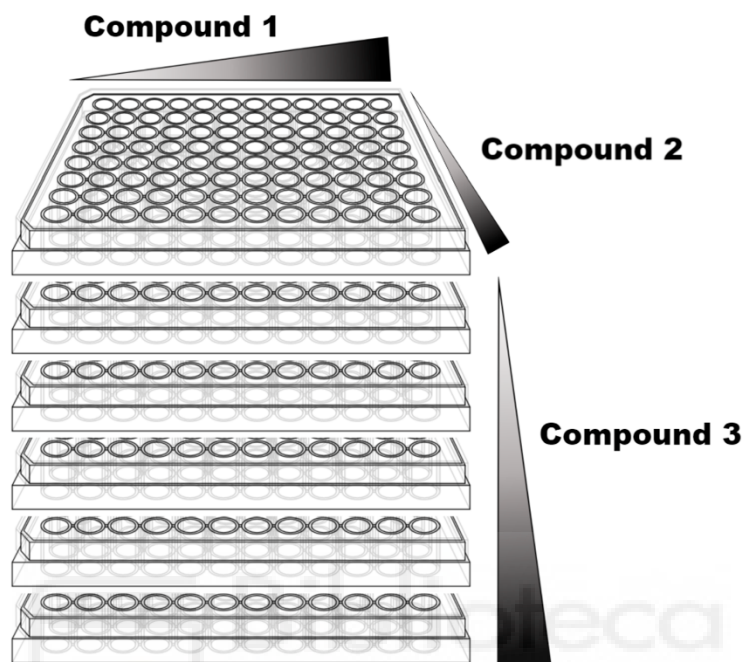
Combined therapies are based on targeting different molecular signatures of the disease. On the one hand, multitargeting makes drug screening more complicated as complex assays must be developed to test all possibilities. On the other hand, multitargeting creates the opportunity to obtain synergic interactions between the combined therapy elements and drug resistance development, as detailed in further sections. There is a plethora of combined chemotherapy treatments covering most of the different cancer phenotypes. In fact, most of the recommended treatment regimens include two or more drugs, but as mentioned above, combined therapy use is not exclusive to cancer treatments, it is also extended to other disciplines such as antimicrobial and antihypertensive diseases.

Synergy is therefore the most relevant characteristic of combined therapies, including natural extracts. The first impetus for synergy research came from pharmaceutical legislation which demands the verification that every compound of a combined pharmaceutical preparation contributes to the claimed complete efficacy [22]. In terms of pharmacology, synergy is the ability of some mixtures to be more potent than the sum of their individual components. This definition is exportable to other disciplines and is based on the complementary as well as additive mechanism of action. Accordingly, synergy is not an absolute factor and the pharmacological interaction between the components of a mixture can be more or less synergic. This aspect is the main difference between additive and synergic behavior and is sometimes forgotten by researchers and clinicians.

Another aspect to be analyzed is that a single mixture is able to perform in a different way depending on the proportion of its components. According to this, different proportions of the same compounds could provide different results in terms of synergy, not only in an absolute way, but also in terms of being more or less synergic [23]. In this sense, an ideal proportion which provides the highest synergy results is always mathematically possible.

There are several ways to develop synergy studies, but in all cases, a previous and detailed design is required to obtain conclusive results. Most synergy studies fail because of a deficient design, both in qualitative and quantitative ways. There are several exhaustive and relevant reviews on synergy [22,24–26], so this review will not go deeper into how to study it. However, some aspects about study design deserve a comment:

- **Drug selection:** The right selection of the drugs for synergy studies is the first step to succeed. There are multiple available drugs for a single disease, but not all are suitable for a synergy study. Drugs must be selected considering different molecular targets. If not, antagonism or other undesired pharmacological interactions can be obtained. These different molecular targets can be located in different molecules, in distinguished epitopes of the same molecule or even in molecules of different pathways.
- **Synergy study method:** As mentioned above, there are several methods to study synergy between drugs. Quantitative methods such as Combination Index (CI) [27] or Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) [14] calculation are preferred as they obtain better conclusions.
- **Biological assay:** According to the selected method for synergy studies, a robust and reliable biological assay must be selected that allows testing a high number of samples with a large variability in composition. Survival or viability tests are diverse and allow high throughput screening approaches [28]. They are commonly used for anticancer compound research, but also for most of the other areas of drug discovery in which synergy is topical, such as antimicrobial drug discovery.
- **Sample testing:** Once the test is selected, an adequate design of the plates is also crucial. Checkboard plate design is probably the best approach for pairwise combinations using multi-wells plates. This strategy can be used not only for pairwise combinations but also for 3-drug combinations as shown in Figure 1.



**Figure 1.** Checkboard plate design can be used not only for single plate experiments but also for more complex studies using three different compounds. In these cases, the concentration of each compound increases in one of the three dimensions ( $x$ ,  $y$  and  $z$  axis) as indicated in the figure.

Following these recommendations, the final results will not only be scientifically relevant, but also comparable to other single drug or combined therapies. This will allow researchers and clinicians to obtain better conclusions and contribute to the development of new therapeutic approaches.

#### 4. Examples of Synergy Studies

References to synergic interactions between drugs in cancer research are abundant in the bibliography. However, focusing on natural extract synergy studies, three main groups of examples can be classified. The first group includes studies covering complex extracts whose components present synergistic interactions among them. The second group includes examples of synergy between different extracts and natural compounds of different origin. Finally, the third group comprises examples of anticancer approved drugs combined with natural compounds or extracts. Some of the most relevant examples of each category are listed below and shown in Table 1.

**Table 1.** Examples of synergic interactions among compounds or compounds and approved drugs in cancer research. Main examples included in this manuscript are shown in this table, organized in rows. First and second columns indicate the name of the components among which synergy is obtained. Third and fourth and fifth columns show the cellular models in which synergy studies were performed (including their origin), the main effect and the bibliographic reference.

Extract/Compound	Synergy	Experimental Model (Cell Line)	Effect	References
Pomegranate extract	Among their compounds	Oral cancer (KB, CAL27), colon cancer (HT-29, HCT116, SW480, SW620) and prostate cancer (RWPE-1, 22Rv1)	Antiproliferative, apoptotic and antioxidant	[29]
Pomegranate extract	Among their compounds	Prostate cancer (DU 145)	Antiproliferative, antimetastatic and phospholipase A2 (PLA2) inhibition	[30]
Grape extract	Among their compounds and with Ara-C and tazofutin	Leukemia (HL-60)	Antiproliferative and apoptotic	[31]
Grape extract	Among their compounds	Colon cancer (HCT116)	Antiproliferative and apoptotic	[32]
Rosemary extract	Among their compounds	Colon cancer (HT29)	Antiproliferative	[33]
Ginger extract	Among their compounds	Prostate cancer (PC-3)	Antiproliferative	[34]
Graviola flavonoids	Among their compounds	Prostate cancer (PC-3)	Antiproliferative	[35]
Turmeric extract	With rosemary compounds	Breast cancer (MDA-MB-453, MDA-MB-468, and MCF7)	Antiproliferative, G1 cell cycle arrest	[36]
Tea extract	With capsicum compounds	Cervical cancer (HeLa) and breast cancer (4T1)	Antiproliferative	[37]
Tea extract	With soy compounds	Mice <i>in vivo</i> model	Metabolic effect	[38]
Tea extract	With soy compounds	Prostate cancer (LnCAP) xenotransplants	Antiproliferative	[39]
Tea extract	With others tea extracts	Review	Antioxidant, antimicrobial and antitumoral	[40]
Resveratrol	With quercetin and ellagic acid	Leukemia (MOLT-4)	Antiproliferative, apoptosis and cell cycle arrest	[41,42]
Carotenoids	With other phytochemicals	Prostate cancer LNCaP, PC-3 and DU-145) and breast cancer (MCF-7) Pancreatic cancer (BxPC-3 xenograft, COL-357 and L3.6pl)	Antiproliferative	[43]
Genistein	With cisplatin, 5-fluorouracil, arsenic trioxide, doxorubicin, gemcitabine camptothecine and hydroxi-camptothecine	Colon cancer (HT29), hepatic cancer (HepG2, Hep3B, SK-Hep-1, HEpG2 xenograft), cervical cancer (HeLa) ovarian cancer (OAW-42), bladder cancer (TCC-SUP) and lung cancer (ME-180pt, UMSCC-5)	Antiproliferative	[44]
Curcumin	With 5-fluorouracil, oxaliplatin, cisplatin, etoposide, camptothecine and doxorubicine	Colon cancer (HT-29), ovarian cancer (2008 and C13) and human and rat glioblastoma cell lines	Antiproliferative	[44]
(-)-epigallocatechin-3-gallate	With doxorubicin, gemcitabine and cisplatin	Carcinoma doxorubicin resistant (KB-A-1 xenograft), cholangiocarcinoma (Mz-ChA-1 cell line and xenograft) and ovarian cancer (SKOC3, CAO3 and C200)	Antiproliferative	[44]
Quercetin	With doxorubicin, cisplatin, arsenic trioxide and temozolomide	Neuroblastoma and Edwing's sarcoma cell lines, laryngeal cancer (Hep2), leukemia (U937 and HL-60) and astrocytoma	Antiproliferative	[44]
Resveratrol	With Cisplatin and doxorubicin	Acute leukemia (ML-2/DX30, AML-2/DX100 and AML-2/DX300)	Antiproliferative	[44]

Pomegranate polyphenolic extracts have demonstrated numerous biological activities such as antioxidant, cardiovascular preventive and antitumoral activities [45–48]. These extracts are enriched in ellagitannins such as ellagic acid, punicalagin and punicalin. Synergy studies between pomegranate polyphenols have been performed in colon cancer cells [29], prostate [30] and other cellular models [49]. Grape fruit is also a well-known source of active compounds, including resveratrol as the most representative one. As with pomegranate, grape extracts present abundant biological activities [31,50]. In regards to cancer and synergy studies, grape polyphenols have shown synergy between them, especially on colon cancer cell models [32]. Rosemary terpenes have also shown antitumoral synergic activity on colon cancer cells [33]. Ginger compounds [34], graviola flavonoids and acetogenin's action on prostate cancer [35] are examples of synergic interactions between different compounds included those that are present in the same extract.

In addition to single complex natural extracts, some studies have tested the synergic interactions between different extracts and/or different natural compounds, even mixing a complex natural

extract with an individual natural compound. On the one hand, turmeric extracts have showed synergic activity with rosemary extracts as well as their representative compounds, carnosic acid and curcumin [36]. Tea natural compounds, mainly catechins, synergistically interact with capsicum compounds [37], soy phytochemicals [38,39] and between different tea extracts [40]. On the other hand, individual compounds such as resveratrol, quercetin and ellagic acid also interact synergistically in human leukemia cells [41,42]. Carotenoids and other phytochemicals also presented similar behavior [43]. Finally, natural compounds and extracts synergistically interact with clinically used anticancer drugs as occurs between many polyphenols and anticancer drugs such as cisplatin, doxorubicin, 5-fluoracil and others as reviewed in Reference [44].

### 5. Drawbacks of Using Natural Compounds

Pure natural compounds have demonstrated the same validity as synthetic or semisynthetic drugs in drug discovery. They are single compounds with a well-known chemical structure. They can be obtained from natural resources, in most cases using synthetic or semisynthetic approaches [51,52]. However, natural extracts, regardless of vegetal, microorganism or animal origin, are usually complex mixtures. Two main consequences are derived from natural extract's complexity. First, these mixtures must be chemically characterized as much as possible. The improvement of analytical techniques such as liquid and gas chromatography coupled to mass detection, magnetic resonance and other approaches have permitted the characterization of very complex extracts [23,53–55]. The second consequence is that natural extract reproducibility is sometimes difficult due to the biological diversity of samples. This depends on origin, climate conditions, storage and extraction procedures. However, as occurred in other disciplines, this drawback can be avoided by controlling crop conditions, origin and extract production.

Natural compound bioavailability is also a drawback that deserves attention. Natural compounds have very different structures and, therefore, their bioavailability depend on the individual compound [56–58]. On the one hand, some natural compounds are quickly and fully absorbed, reaching the plasma in their native form so providing significant plasmatic concentrations. On the other hand, other natural compounds have scarce absorption, high metabolized rates and a fast excretion process. In all these cases, plasmatic concentration are low and biological activities are difficult to infer. Some strategies have been developed to improve natural compound bioavailability. Such as the use of different forms of encapsulation [59]; as nanoparticles [60,61], emulsion [62] or liposomes [63]. These approaches have been used especially to increase the solubility of highly hydrophobic compounds and extracts, and to improve the bioavailability of hydrophilic compounds with low stability or poor absorption [64,65]. However, in the end, natural compounds are not quite as different to other drugs that also present bioavailability limitations, and each case must be studied independently taking in account its solubility and the ADME processes.

Drug resistance is probably the most important problem of cancer treatments. There are many drug resistance mechanisms [66,67] and no drug is free to develop a resistant phenotype. Once again, natural compounds and extracts are not different to other drugs, and resistance phenomena may also take place. Combined therapies minimize the risk of drug resistance, as tumor cells that develops resistance against one of the drugs may be affected by other drugs or compounds present in the same mixture. In this sense, natural pure compounds perform as any other drug and can be used in combination to reduce resistance, but natural extracts are mixtures that may act as a combined therapy itself, contributing to a decrease in drug-resistant phenotypes.

### 6. Concluding Remarks

The current state of the art shows that combined therapies using natural extracts or combination of natural compounds and polypharmacology are quite promising. This is due to both the synergic interactions between their components and the reduction of drug resistant phenotype risk. Natural extracts are naturally occurring mixtures that have been selected by hormesis processes



11. Ruiz-Torres, V.; Losada-Echeberria, M.; Herranz-López, M.; Barrajon-Catalan, E.; Galiano, V.; Micol, V.; Encinar, A.J. New Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Modulators Derived from Natural Product Databases and Marine Extracts by Using Molecular Docking Techniques. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bellamy, W.T. Prediction of Response to Drug Therapy of Cancer: A Review of In Vitro Assays. *Drugs* **1992**, *44*, 690–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nyga, A.; Cheema, U.; Loizidou, M. 3D tumour models: Novel in vitro approaches to cancer studies. *J. Cell Commun. Signal.* **2011**, *5*, 239–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Barrajon-Catalan, E.; Herranz-Lopez, M.; Joven, J.; Segura-Carretero, A.; Alonso-Villaverde, C.; Menendez, J.A.; Micol, V. Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: Far beyond their antioxidant properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *824*, 141–159. [[PubMed](#)]
15. Joven, J.; Rull, A.; Rodriguez-Gallego, E.; Camps, J.; Riera-Borrull, M.; Hernández-Aguilera, A.; Martin-Paredero, V.; Segura-Carretero, A.; Micol, V.; Alonso-Villaverde, C.; et al. Multifunctional targets of dietary polyphenols in disease: A case for the chemokine network and energy metabolism. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 267–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rejhová, A.; Opatková, A.; Čumová, A.; Slíva, D.; Vodička, P. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 582–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Howitz, K.T.; Sinclair, D.A. Xenohormesis: Sensing the chemical cues of other species. *Cell* **2008**, *133*, 387–391. [[CrossRef](#)]
18. Menendez, J.A.; Joven, J.; Aragones, G.; Barrajon-Catalan, E.; Beltran-Debon, R.; Borrás-Linares, I.; Camps, J.; Corominas-Faja, B.; Cufí, S.; Fernandez-Arroyo, S.; et al. Xenohormetic and anti-aging activity of secoiridoid polyphenols present in extra virgin olive oil: A new family of gerosuppressant agents. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 555–578. [[CrossRef](#)]
19. Ruiz-Torres, V.; Encinar, J.; Herranz-López, M.; Pérez-Sánchez, A.; Galiano, V.; Barrajon-Catalan, E.; Micol, V. An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. *Molecules* **2017**, *22*, 1037. [[CrossRef](#)]
20. Grochowski, D.M.; Skalicka-Wozniak, K.; Orhan, I.E.; Xiao, J.; Locatelli, M.; Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Tomczyk, M. A comprehensive review of agrimoniin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1401*, 166–180. [[CrossRef](#)]
21. Grochowski, D.M.; Locatelli, M.; Granica, S.; Cacciagrano, F.; Tomczyk, M. A Review on the Dietary Flavonoid Tiliroside. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1395–1421. [[CrossRef](#)]
22. Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 97–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tomas-Menor, L.; Barrajon-Catalan, E.; Segura-Carretero, A.; Marti, N.; Saura, D.; Menendez, J.A.; Joven, J.; Micol, V. The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: An opportunity to improve the performance of antibiotics? *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 466–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Roell, K.R.; Reif, D.M.; Motsinger-Reif, A.A. An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from Across Disciplines. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chou, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 440–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Greco, W.R.; Bravo, G.; Parsons, J.C. The search for synergy: A critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* **1995**, *47*, 331–385. [[PubMed](#)]
27. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 621–681. [[CrossRef](#)]
28. Stoddart, M.J. Cell viability assays: Introduction. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)* **2011**, *740*, 1–6.
29. Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Henning, S.M.; Niu, Y.; Zhang, Y.; Nair, M.G.; Heber, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 360–367. [[CrossRef](#)]
30. Lansky, E.P.; Jiang, W.; Mo, H.; Bravo, L.; Froom, P.; Yu, W.; Harris, N.M.; Neeman, I.; Campbell, M.J. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 11–20. [[CrossRef](#)]

that can be beneficial to humans according to xenohormesis theory. They are indeed real combined therapies that, if well selected and characterized, can be used for new anticancer drugs development. In this sense, the design of high-quality synergy studies is crucial and a supplementary effort in this sense is worthy.

But not everything may be considered an advantage when using natural extracts, they share some drawbacks with conventional anticancer drugs. Poor bioavailability and drug resistance mechanisms are as common among natural extracts as with conventional drugs. However, the polypharmacological properties of natural extracts makes resistance more difficult and, as occurred with other conventional drugs, bioavailability problems can be addressed using different approaches such as encapsulation. The most important disadvantage of natural extracts is their complexity and reproducibility, but as mentioned above, technical advances and quality controls during processing can overcome this problem.

In conclusion, natural extracts are a promising source of new anticancer drugs, but also suppose a challenging issue. As in the past, natural extracts will continue to be used as sources to develop new anticancer agents. These compounds have been selected on an evolutionary basis that may suppose an advantage for their performance.

Nevertheless, the same criteria for safety, efficacy and quality that are required for their synthetic counterparts must be expected. Strong efforts must be applied in extract characterization and in synergy studies. Despite these challenges, natural extracts are an irreplaceable source of new anticancer compounds that undoubtedly will allow the development of new anticancer therapies in the future.

**Funding:** This research was funded by projects AGL2015-67995-C3-1-R, AGL2015-67995-C3-2-R and AGL2015-67995-C3-3-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO); and PROMETEO/2012/007, PROMETEO/2016 ACIF/2010/162, ACIF/2015/158, ACIF/2016/230 and APOSTD/2017/023 grants from *Generalitat Valenciana*.

**Acknowledgments:** Authors want to thank their lab supervisor, Vicente Micol, for his invaluable support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Diamandis, M.; White, N.M.A.; Yousef, G.M. Personalized medicine: Marking a new epoch in cancer patient management. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1175–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jain, K.K. Personalized medicine. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2002**, *4*, 548–558. [[PubMed](#)]
4. Olopade, O.I.; Grushko, T.A.; Nanda, R.; Huo, D. Advances in breast cancer: Pathways to personalized medicine. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7988–7999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wang, E.; Zaman, N.; McGee, S.; Milanese, J.S.; Masoudi-Nejad, A.; O'Connor-McCourt, M. Predictive genomics: A cancer hallmark network framework for predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *30*, 4–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Scott, A.M.; Wolchok, J.D.; Old, L.J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 278–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Weiner, L.M.; Surana, R.; Wang, S. Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317–327. [[CrossRef](#)]
8. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196. [[CrossRef](#)]
9. Arora, A.; Scholar, E.M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 971–979. [[CrossRef](#)]
10. Edelman, L.B.; Eddy, J.A.; Price, N.D. In silico models of cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2010**, *2*, 438–459. [[CrossRef](#)]

31. Athar, M.; Back, J.H.; Tang, X.; Kim, K.H.; Kopelovich, L.; Bickers, D.R.; Kim, A.L. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 274–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Radhakrishnan, S.; Reddivari, L.; Sclafani, R.; Das, U.N.; Vanamala, J. Resveratrol potentiates grape seed extract induced human colon cancer cell apoptosis. *Front. Biosci. Elite* **2011**, *3E*, 1509–1523. [[CrossRef](#)]
33. Pérez-Sánchez, A.; Barrajón-Catalán, E.; Ruiz-Torres, V.; Agulló-Chazarra, L.; Herranz-López, M.; Valdés, A.; Cifuentes, A.; Micol, V. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract causes ROS-induced necrotic cell death and inhibits tumor growth in vivo. *Sci. Rep.* **2018**. [[CrossRef](#)]
34. Brahmabhatt, M.; Gundala, S.R.; Asif, G.; Shamsi, S.A.; Aneja, R. Ginger phytochemicals exhibit synergy to inhibit prostate cancer cell proliferation. *Nutr. Cancer* **2013**, *65*, 263–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yang, C.; Gundala, S.R.; Mukkavilli, R.; Vangala, S.; Reid, M.D.; Aneja, R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 656–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Einbond, L.S.; Wu, H.A.; Kashiwazaki, R.; He, K.; Roller, M.; Su, T.; Wang, X.; Goldsberry, S. Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1160–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Morré, D.J.; Morré, D.M. Synergistic Capsicum-tea mixtures with anticancer activity. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 987–994. [[CrossRef](#)]
38. Zhou, J.R.; Li, L.; Pan, W. Dietary soy and tea combinations for prevention of breast and prostate cancers by targeting metabolic syndrome elements in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 882S–888S. [[CrossRef](#)]
39. Zhou, J.R.; Yu, L.; Zhong, Y.; Blackburn, G.L. Soy phytochemicals and tea bioactive components synergistically inhibit androgen-sensitive human prostate tumors in mice. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 516–521. [[CrossRef](#)]
40. Malongane, F.; McGaw, L.J.; Mudau, F.N. The synergistic potential of various teas, herbs and therapeutic drugs in health improvement: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 4679–4689. [[CrossRef](#)]
41. Mertens-Talcott, S.U.; Percival, S.S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett.* **2005**, *218*, 141–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mertens-Talcott, S.U.; Bomser, J.A.; Romero, C.; Talcott, S.T.; Percival, S.S. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21 waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 609–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Linnewiel-Hermoni, K.; Khanin, M.; Danilenko, M.; Zango, G.; Amosi, Y.; Levy, J.; Sharoni, Y. The anti-cancer effects of carotenoids and other phytonutrients resides in their combined activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *572*, 28–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lewandowska, U.; Gorlach, S.; Owczarek, K.; Hrabec, E.; Szewczyk, K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2014**, *68*, 528–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Basu, A.; Penugonda, K. Pomegranate juice: A heart-healthy fruit juice. *Nutr. Rev.* **2009**, *67*, 49–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bell, C.; Hawthorne, S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer—A mini review. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 139–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Landete, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1150–1160. [[CrossRef](#)]
48. Larrosa, M.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 513–539. [[CrossRef](#)]
49. Bishayee, A.; Bishayee, A. Pomegranate-derived constituents as inducers of cell death: Implications in cancer prevention and therapy. In *Natural Compounds as Inducers of Cell Death*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012; Volume 1, pp. 33–47.
50. Xia, E.Q.; Deng, G.F.; Guo, Y.J.; Li, H.B. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 622–646. [[CrossRef](#)]
51. Herzon, S.B.; Vanderwal, C.D. Introduction: Natural Product Synthesis. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11649–11650. [[CrossRef](#)]
52. Hale, K.J. (Ed.) *The Chemical Synthesis of Natural Products*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2000.






53. Barrajón-Catalán, E.; Fernández-Arroyo, S.; Roldán, C.; Guillen, E.; Saura, D.; Segura-Carretero, A.; Micol, V. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 303–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Borrás-Linares, I.; Herranz-López, M.; Barrajón-Catalán, E.; Arráez-Román, D.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.; Gutiérrez, A.F.; Micol, V.; Segura-Carretero, A. Permeability study of polyphenols derived from a phenolic-enriched hibiscus sabdariffa extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18396–18411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Borrás-Linares, I.; Pérez-Sánchez, A.; Lozano-Sánchez, J.; Barrajón-Catalán, E.; Arráez-Román, D.; Cifuentes, A.; Micol, V.; Carretero, A.S. A bioguided identification of the active compounds that contribute to the antiproliferative/cytotoxic effects of rosemary extract on colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *80*, 215–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Olivares-Vicente, M.; Barrajón-Catalán, E.; Herranz-López, M.; Segura-Carretero, A.; Joven, J.; Encinar, J.A.; Micol, V. Plant-derived polyphenols in human health: Biological activity, metabolites and putative molecular targets. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 351–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1321–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds: A review. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 793–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Khushnud, T.; Mousa, S.A. Potential role of naturally derived polyphenols and their nanotechnology delivery in cancer. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *55*, 78–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Liang, J.; Yan, H.; Puligundla, P.; Gao, X.; Zhou, Y.; Wan, X. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. *Food Hydrocoll.* **2017**, *69*, 286–292. [[CrossRef](#)]
62. Lu, W.; Kelly, A.L.; Miao, S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *47*, 1–9. [[CrossRef](#)]
63. Mignet, N.; Seguin, J.; Chabot, G.G. Bioavailability of polyphenol liposomes: A challenge ahead. *Pharmaceutics* **2013**, *5*, 457–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Aditya, N.P.; Espinosa, Y.G.; Norton, I.T. Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 450–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Barrajón-Catalán, E.; Funes, L.; Herranz-López, M.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.V.M. Differential absorption of curcuminoids between free and liposomal curcumin formulations. In *Curcumin: Clinical Uses, Health Effects and Potential Complications*; Martin, V., Ed.; Nova Publishers: Hauppauge, NY, USA, 2016; pp. 99–110.
66. Gottesman, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Mimeault, M.; Hauke, R.; Batra, S.K. Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 673–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

# New Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Modulators Derived from Natural Product Databases and Marine Extracts by Using Molecular Docking Techniques

Verónica Ruiz-Torres <sup>1</sup>, María Losada-Echeberría <sup>1</sup>, María Herranz-López <sup>1</sup>,  
Enrique Barrajón-Catalán <sup>1</sup>, Vicente Galiano <sup>2</sup>, Vicente Micol <sup>1,3</sup>  
and José Antonio Encinar <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Research, Development and Innovation in Biotechnology of Elche (IDiBE) and Molecular and Cell Biology Institute (IBMC), Miguel Hernández University (UMH), Elche, 03202 Alicante, Spain; vruiz@umh.es (V.R.-T.); mlosada@umh.es (M.L.-E.); mherranz@umh.es (M.H.-L.); e.barrajon@umh.es (E.B.-C.); vmicol@umh.es (V.M.)

<sup>2</sup> Department of Physics and Computer Architecture, Miguel Hernández University (UMH), Elche, 03202 Alicante, Spain; vgaliano@umh.es

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) (CB12/03/30038), Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III, 07122 Palma de Mallorca, Spain

\* Correspondence: jant.encinar@umh.es; Tel.: +34-96-65-84-53; Fax: +34-96-665-87-58

Received: 24 September 2018; Accepted: 12 October 2018; Published: 15 October 2018



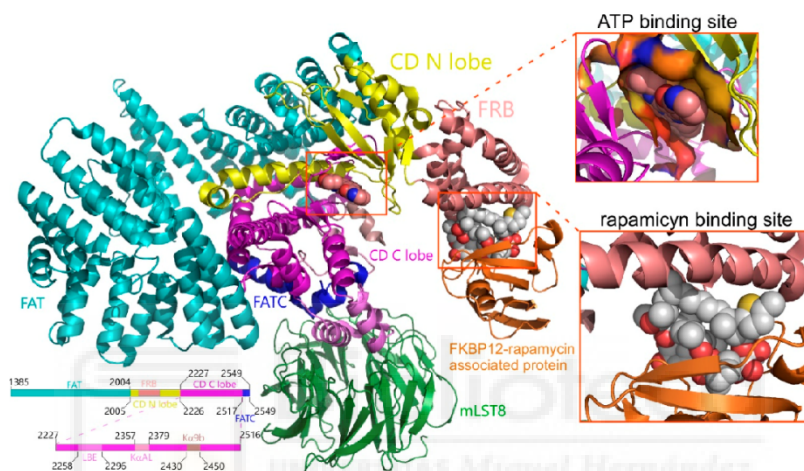
**Abstract:** Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a PI3K-related serine/threonine protein kinase that functions as a master regulator of cellular growth and metabolism, in response to nutrient and hormonal stimuli. mTOR functions in two distinct complexes—mTORC1 is sensitive to rapamycin, while, mTORC2 is insensitive to this drug. Deregulation of mTOR's enzymatic activity has roles in cancer, obesity, and aging. Rapamycin and its chemical derivatives are the only drugs that inhibit the hyperactivity of mTOR, but numerous side effects have been described due to its therapeutic use. The purpose of this study was to identify new compounds of natural origin that can lead to drugs with fewer side effects. We have used computational techniques (molecular docking and calculated ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) parameters) that have enabled the selection of candidate compounds, derived from marine natural products, SuperNatural II, and ZINC natural products, for inhibitors targeting, both, the ATP and the rapamycin binding sites of mTOR. We have shown experimental evidence of the inhibitory activity of eleven selected compounds against mTOR. We have also discovered the inhibitory activity of a new marine extract against this enzyme. The results have been discussed concerning the necessity to identify new molecules for therapeutic use, especially against aging, and with fewer side effects.

**Keywords:** mTOR kinase; marine natural products; natural products; inhibitors; aging; obesity; cancer; virtual screening; molecular docking; calculated ADMET

## 1. Introduction

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a highly conserved phosphoinositide 3-kinase (PI3K-like) Ser/Thr protein kinase (UniProt P42345), which plays an important role in the center of numerous cellular signaling pathways that control the organization of the cell's cytoskeleton, autophagy, metabolism, survival and proliferation, and integrates the growth factor-activated and nutrient-sensing pathways [1]. It is known that mTOR binds to different regulatory subunits and forms

two types of protein complexes. First, mTORC1, which is sensitive to rapamycin and is a macrolide antibiotic produced by *Streptomyces hygroscopicus* that forms a complex with the immunophilin FK506 binding protein-12 (FKBP12) (Figure 1), which binds to the FKBP12-rapamycin binding (FRB) domain of mTOR [2] and inhibits its kinase activity [3]. Second, mTORC2, in which mTOR forms a protein complex insensitive to rapamycin [4]. In addition to mTOR, the mTORC1 complex contains the following proteins—regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR), proline-rich Akt substrate 40 kDa (PRAS40), mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8), and DEP domain containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) [3].



**Figure 1.** Secondary structure of the mTOR (residues 1376–2549)-SEC13 protein 8 (or mLST8)-FK506-binding protein 12 (or FKBP12)-ATP-rapamycin complex. mTOR presents different colors, indicating its structural domains [2]. mLST8 is colored green, KBP12 is colored orange, and ATP and rapamycin are shown as spheres. CD is the catalytic domain. The ATP and rapamycin binding sites were expanded in the boxes to the right. The figure was constructed using the structural information of the PDBs numbered as 4J5N, 4J5P, 4J5V, 4J5X, 4J5T, 4JT6, 5WBU, 5WBY, 1FAP, 1NSG, 2FAP, 3FAP, 4FAP, 5GPG, 4DRH, 4DRI, and 4DRJ, and PyMol 2.0 software (Schrödinger, Inc., New York, NY, USA) was used.

In the plasma membrane, several receptors (GPCR, G protein-coupled receptor; IGF-R, insulin-like growth factor receptor; IR, insulin receptor) capture the signal transmitted by growth factors and chemokines, which act as positive inputs of the mTORC1 complex, directed mainly through two signaling pathways—PI3K/Akt [5] and Ras/Raf/MEK/ERK [6]. Additionally, nutrients such as glucose or amino acids and the cellular energy status (high ATP:AMP ratio) are inputs positive to the mTORC1 complex [7]. Low cellular energy levels are sensed by AMPK, which sequentially phosphorylates the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and activates it, leading to the inhibition of the mTORC1 activity [8]. In poorly vascularized tumors, hypoxia conditions are predominant. Therefore, the complete oxidation of glucose to CO<sub>2</sub>, to achieve ATP and reduce power (NADH and FADH<sub>2</sub>), is impossible. Under these conditions of the lack of O<sub>2</sub>, glucose undergoes partial oxidation until pyruvate (glycolysis) in the cellular cytoplasm and the NADH generated is re-oxidized, giving its electrons to pyruvate that becomes lactate (Warburg effect) [9]. These conditions of acidity [10] and hypoxia [11] impede the activity of mTORC1. On the other hand, several extracellular signals [insulin, epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), sphingosine 1-phosphate (S1P), and lysophosphatidic acid] stimulate phospholipase D, which converts phosphatidyl choline (PC) into phosphatidic acid (PA) [12]. PA species with unsaturated fatty acid chains can dissociate DEPTOR from mTORC1 and, thus, increase its activity [13].

An active mTORC1 complex controls protein biosynthesis because it directly phosphorylates two components of the biosynthetic machinery—p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1-Thr<sup>389</sup>) and the translation inhibitor eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) [14,15]. Only when 4E-BP1 has been phosphorylated, can it be bound to eIF4E. As a result, this protein can be part of the eIF4F complex, which is required for the initiation of a cap-dependent mRNA translation [14]. mTORC1 also controls both membrane lipid biosynthesis, especially through two transcription factors of lipogenic genes, namely, SREBP 1/2 and PPAR- $\gamma$ , and the genes of the glycolytic pathway [7]. By contrast, mTORC1 is a negative regulator of autophagy because it directly phosphorylates and suppresses some components of the ULK1/Atg13/FIP200 complex, which must remain active to initiate the process of autophagy [16]. In vascularized tumors, mTORC1 plays an important role as a central mediator of signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3), hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), and angiogenesis, under hypoxia, through several signaling mechanisms [17].

The biology of the mTORC2 complex (DEPTOR, SIN1, RICTOR, mLST8, and PROTOR) is less known but its activity is controlled by the PI3K/Akt and WNT receptors [18] signaling pathways. mTORC2 regulates the organization of the actin in the cytoskeleton, through various effectors, such as paxillin, Rho GTPases, or PKC-alpha. Additionally, mTORC2 controls diverse cellular processes, such as metabolism, survival, apoptosis, and growth, through the phosphorylation of various effectors; particularly, it directly phosphorylates two other protein kinases, Akt-Ser<sup>473</sup> and serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) [7].

It was described that the deregulation of the signaling pathways, both upstream and downstream of the mTORC1/mTORC2 is implicated in various diseases, such as aging, autoimmune disorders, neurodegenerative diseases, diabetes mellitus type II, obesity, and cancer [19]. Several epidemiological studies have related obesity to a high incidence of gastrointestinal cancers (esophageal, gastric, pancreatic, and colorectal) [20]. The mTOR signaling pathway plays an indispensable role in the regulation of adipose tissue functions, such as adipogenesis, thermogenesis, or lipid metabolism. Therefore, its modulation is important in the control of obesity, which is generated in circumstances of an abundance of nutrients [21].

Currently, different pharmacological options have been developed to inhibit mTOR, producing three generations of mTORC1 inhibitors, and their therapeutic efficacy and side effects are different in each case [22]. Both rapamycin and its chemical derivatives belong to the first generation of mTORC1 inhibitors. Despite being approved for the treatment of different types of cancer, they only cause stabilization of the disease, and not a tumor regression. That is, they behave as cytostatic and not as cytotoxic [22]. In addition, its continued clinical use causes numerous adverse effects, including suppression of the immune system, renal, dermatological, and hematological toxicity, and reduction of male fertility. Thus, in the current abundant clinical trials with rapalogs, their combination is sought, in lower doses, with other chemotherapy or radiotherapy agents to improve outcomes and overcome resistance [23]. The second generation of the mTOR inhibitors inhibits the catalytic kinase domain as ATP-competitive inhibitors and, therefore, controls the activity of both mTORC1 and mTORC2. Due to the structural similarities of the catalytic domain within the protein kinase superfamily [24], ATP-competitive inhibitors also block other kinases [25]. Additionally, various resistant mutations that interfere with drug-binding in the mTOR, have been described in both rapalogs and kinase inhibitors [26]. A third, new-generation of mTOR inhibitors is in experimental development to eliminate the resistance, and they consist of a bivalent drug that can bind simultaneously to the catalytic and regulator sites of the mTOR [26].

Considering the above-mentioned perspectives, the development of drugs targeted to mTOR, in gastrointestinal cancers associated with obesity or anti-aging, is an open field. Given the abundant structural information on the catalytic and regulator domains of mTOR, we have carried out an *in silico* study, to identify new potential inhibitors. We have used molecular docking techniques to select candidates among the compounds contained in the databases of marine natural products [27], Super Natural II [28], and ZINC natural products [29]. The compounds that showed the best binding scores were

subsequently filtered using criteria from pharmacodynamics, pharmacokinetics, and toxicity properties. In a later step, we grouped the compounds with a structural similarity greater than or equal to 70%, to choose candidates to test in vitro that are representative of each cluster. We have tested the cytotoxic and inhibitory capacity of some compounds designed against the rapamycin binding site of the mTOR.

## 2. Results

### 2.1. Analysis of Compounds Docked to ATP and the Rapamycin Binding Sites of the mTOR Catalytic Domain

The molecular docking experiments aim to make a first selection of compounds with a low Gibbs free energy variation value ( $\Delta G$ , kcal/mol), and then of potentially higher affinity, starting from a library of 484,527 compounds (including 14,442 from Marine Natural Products [27], 144,766 from ZINC natural products [29], and 325,319 from Super Natural II [28]). We have used all the structures available, thus far, to carry out the molecular docking at both of the ATP binding site (4JSN, 4JSP, 4JSV, 4JSX, 4JT5, 4JT6, 5WBU, 5WBY) and rapamycin (1FAP, 1NSG, 2FAP, 3FAP, 4FAP, 5GPG, 4DRH, 4DRI, 4DRJ) binding site. The data calculated after the molecular docking, presents, for each compound, up to twenty poses of that compound, bound to each of the explored binding site (ATP or rapamycin binding sites, see Figure 1) for all of the above-mentioned structures; likewise,  $\Delta G$  was calculated. For each compound, we chose the pose with the lowest  $\Delta G$  against each structure and expressed the values as the means and standard deviation. The calculated  $K_D$  ( $K_D = \exp^{\Delta G/RT}$ ) for compounds with  $\Delta G \leq -11$  kcal/mol is in the subnanomolar range that was used as a threshold to filter the docking results [30–32]. When the results obtained for the rapamycin binding site were analyzed, 4.8% (692 compounds) of the marine natural product database had an average  $\Delta G$  value less than or equal to  $-11$  kcal/mol. More than 10% (33,635 compounds) of the Super Natural II had a  $\Delta G \leq -11$  kcal/mol, and only 0.098% (142 compounds) of the ZINC natural product database met that condition. Only 0.25% (820 compounds) of the Super Natural II had a  $\Delta G \leq -13$  kcal/mol. Analysis of the molecular docking data on the ATP binding site revealed a low number of compounds with a  $\Delta G \leq -11$  kcal/mol, only twenty-three from the marine natural product database and a hundred and seven from the Super Natural II database. The average  $\Delta G \pm SD$  values for these compounds can be found in the supplementary material (Supplementary Tables S1–S5). Although we filtered the complete chemical library, considering the molecular docking data, we only discarded 89.4% of the compounds. Obviously, additional filters are needed until an approachable number of candidate compounds are obtained to be tested in vitro. The existence of a suitable ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) profile for the initially selected compounds, will constitute the second filter, before proposing the compound candidates as the mTOR inhibitors.

We analyzed different parameters of the ADMET profile of compounds that bind to different protein kinases—in many cases, drugs for clinical use—and for which experimental data were recorded in the bindingDB [33]. At the time of preparing Figure 2, the search terms ‘protein kinase’, ‘mTOR kinase’, and ‘PI3K’ generated 125,289, 4258, and 2883 results, respectively, in the bindingDB database (<https://www.bindingdb.org/bind/as.jsp>). The 3D chemical structure of these compounds was downloaded from the bindingDB; for each, the fourteen parameters represented in Figure 2, were calculated. As shown in Figure 2, thirteen of the fourteen analyzed parameters showed a Gaussian distribution at a frequency where 80–90% of the values of these parameters varied by the total surface area (A), topological polar surface area (B), calculated LogS (C), molecular weight (D), calculated logP (E), hydrogen-bond acceptors (F), violations of Lipinski’s rule of five (G), hydrogen-bond donors (H), drug likeness (I), drug score (J), calculated Caco-2 permeability (K), calculated rat acute toxicity (L), calculated *Tetrahymena pyriformis* toxicity (M), and calculated fish toxicity (N). The extreme values of these Gaussian distributions will be used as a screening filter for candidate compounds against the mTOR kinase activity. Only compounds that present the fourteen analyzed parameters, with values included between the extreme values of the Gaussian distributions, were selected after the application of this second filter. The minimum and maximum values of the fourteen parameters analyzed were as follows: 140 to 490 for the total surface area, 30 to 195 for the topological polar surface area,  $-13$  to 0.2 for the calculated LogS, 250 to 750 for



the molecular weight,  $-1$  to  $6.5$  for the calculated  $\log P$ ,  $0$  to  $13$  for hydrogen-bond acceptors,  $0$  to  $7$  for hydrogen-bond donors,  $-10$  to  $10$  for drug likeness,  $0.05$  to  $0.8$  for drug score,  $-0.16$  to  $1.8$  for the calculated Caco-2 permeability ( $\text{LogP}_{app}$ ,  $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $2$  to  $3.15$  for the calculated rat acute toxicity ( $\text{LD}_{50}$ ,  $\text{mol}/\text{kg}$ ),  $0.1$  to  $1.1$  for the calculated *Tetrahytnema pyriformis* toxicity ( $\text{pIC}_{50}$ ,  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), and  $0.8$  to  $2$  for the calculated fish toxicity ( $\text{pLC}_{50}$   $\text{mg}/\text{L}$ ). Up to two violations of Lipinski's rules were admitted. After selecting only those compounds whose physicochemical and toxicological parameters mentioned above were within the limit values, the number of candidate compounds for mTOR inhibitors was considerably reduced. Only fifty-one compounds (6 from the marine natural product database [27] and 45 from the Super Natural II database [28]) were selected as candidates for inhibitors whose target was the ATP binding site of the mTOR (see Supplementary Table S6). The number of candidates, for inhibitors against the rapamycin binding site, was also significantly reduced, although their number was higher—445 (137 from the marine natural product database [27], 99 from ZINC natural products [29], and 209 from the Super Natural II database [28]) (see Supplementary Table S7).

Among the compounds proposed as candidates for mTOR inhibitors, high structural diversity was evident, judging by the high number of clusters in which they could be grouped—twenty-six compounds that targeted the ATP binding site and a hundred and six that targeted the rapamycin binding site (see Supplementary Tables S6 and S7). Figure 3 shows the Gibbs free energy variations calculated for the compounds docked to mTOR, against both the ATP and rapamycin binding sites, and are included in Supplementary Tables S6 and S7; in all cases,  $\Delta G$  values were  $\leq -11$  kcal/mol. Figure 3A shows the calculated Gibbs free energy variations for the forty compounds approved by the Food and Drug Administration (FDA) as antineoplastic drugs, after molecular docking experiments against the ATP binding site of both mTOR and PI3K, which is a protein kinase highly related to the mTOR. From these data, two important conclusions were obtained. First, all of the compounds had an almost identical affinity to the ATP binding site of both protein kinases. Second, its affinity was relatively low (about  $-9$  kcal/mol) compared with that of the candidate compounds included in Figure 3B, with  $\Delta G$  values  $\leq -11$  kcal/mol. As shown in Figure 3B, among the compound candidates for mTOR inhibitors, we could distinguish both compounds whose  $\Delta G$  were practically the same as that of the mTOR and PI3K, and compounds that differed by up to two kcal/mol, of which we would have expected high specificity in the inhibition of both protein kinases. In a recent article [34], it was shown that the compound “9m” showed low nanomolar activity against mTOR ( $\text{IC}_{50} = 7$  nM) and greater selectivity over the related PIKK family kinases. The authors proposed a binding mode of compound “9m” with the ATP binding site of mTOR. On the other hand, Figure 3C shows the Gibbs free energy variations of compounds docked to the rapamycin binding site; these compounds have been described in the literature as modulators of mTOR and have been obtained from the bindingDB database [33] (4259 compounds, of which the 56 with minor  $\Delta G$  are shown in the panel (C)). Here, we could distinguish two groups, a group of compounds with a  $\Delta G$  over  $-12$  kcal/mol and another group with  $\Delta G$  over  $-18$  kcal/mol. The latter group included rapamycin and its chemical derivatives. The compounds selected as candidates for mTOR inhibitors (Figure 3D–K) have  $\Delta G$  values that varied between  $-15$  and  $-11$  kcal/mol. Most of the compounds included in the databases, such as Super Natural II, ZINC natural products, and, especially, marine natural products, were not commercially available in adequate quantities and at an affordable price to carry out in vitro experiments. In fact, commercial availability was the “third selective filter” of compound candidates for mTOR inhibitors. The definition of clusters of compounds, with up to 70% identity in their structure, was a strategy that enabled the use of at least one representative compound of each cluster to test their inhibitory activity. We have not found examples in the literature of compounds, other than rapamycin or their chemical derivatives, that target the rapamycin binding site to inhibit the enzymatic activity of mTOR. Thus, it seemed conceptually innovative to target this regulatory site with non-rapamycin compounds. Additionally, the observation of its crystalline structure had revealed that its cavity was much larger than that of the ATP binding site. This would explain the greater number of candidate inhibitor compounds that we have found against the regulatory site of the mTOR. Consequently, we selected

eleven commercially available compounds (see Figure 4) to test their in vitro inhibitory activity on mTOR kinase activity; each of these belonged to different clusters (except for cluster 7) with numerous compounds, of which we chose two compounds.

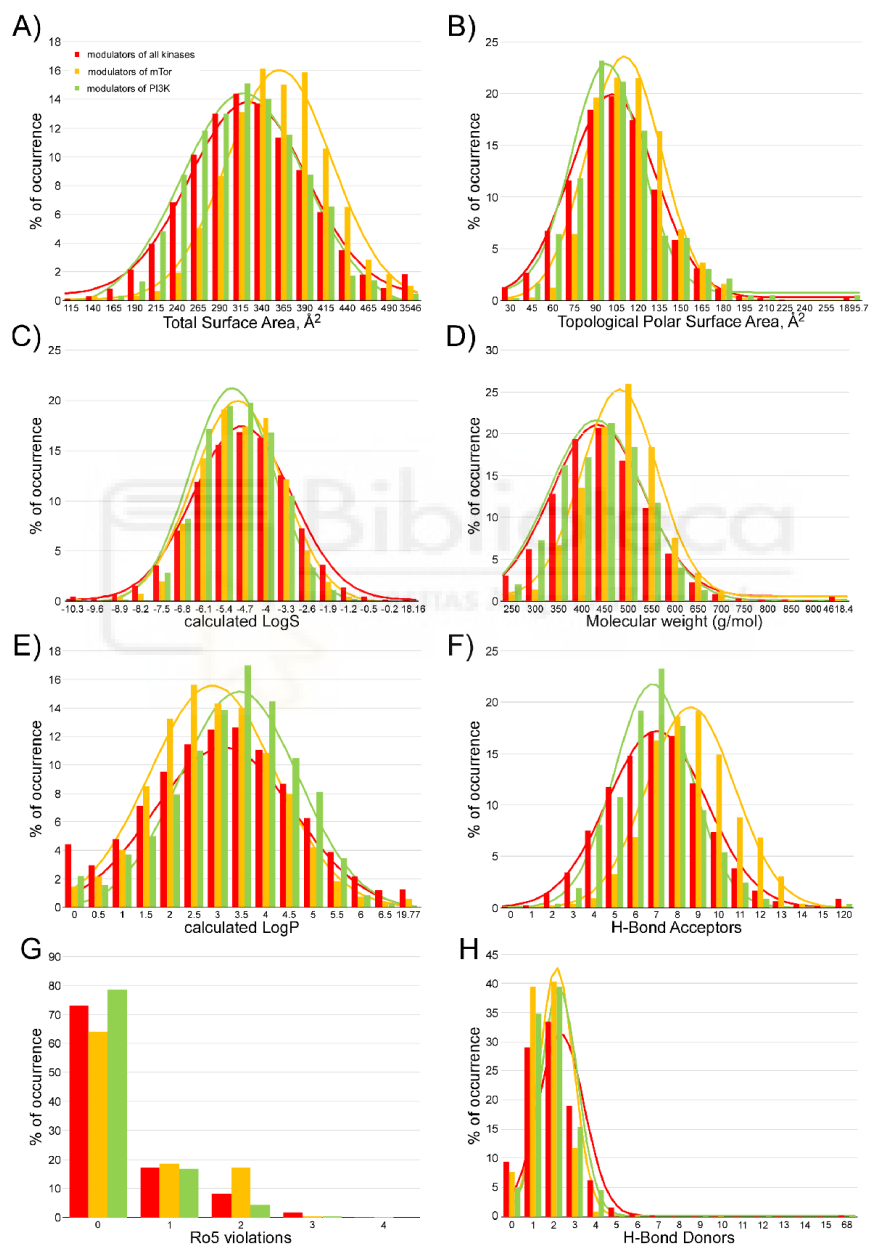
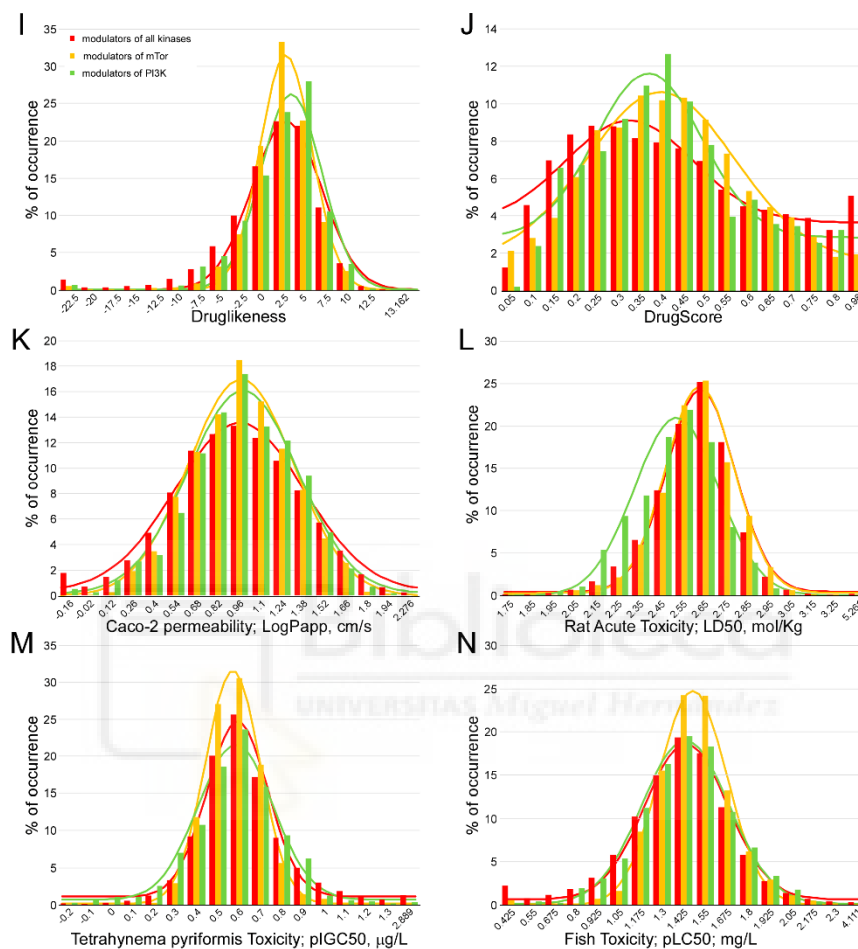


Figure 2. Cont.



**Figure 2.** Analysis of the physicochemical and toxicological parameters of compounds that bind to all protein kinases, mTOR and PI3K from the bindingDB (<https://www.bindingdb.org/>) [33]. Gaussian distribution of the frequency of the calculated values for different parameters: Total surface area (A), topological polar surface area (B), calculated LogS (C), molecular weight (D), calculated logP (E), hydrogen-bond acceptors (F), violations of Lipinski's rule of five (G), hydrogen-bond donors (H), drug-likeness (I), drug-score (J), Caco-2 permeability (K), rat acute toxicity (L), *Tetrahymena pyriformis* toxicity (M), and fish toxicity (N).

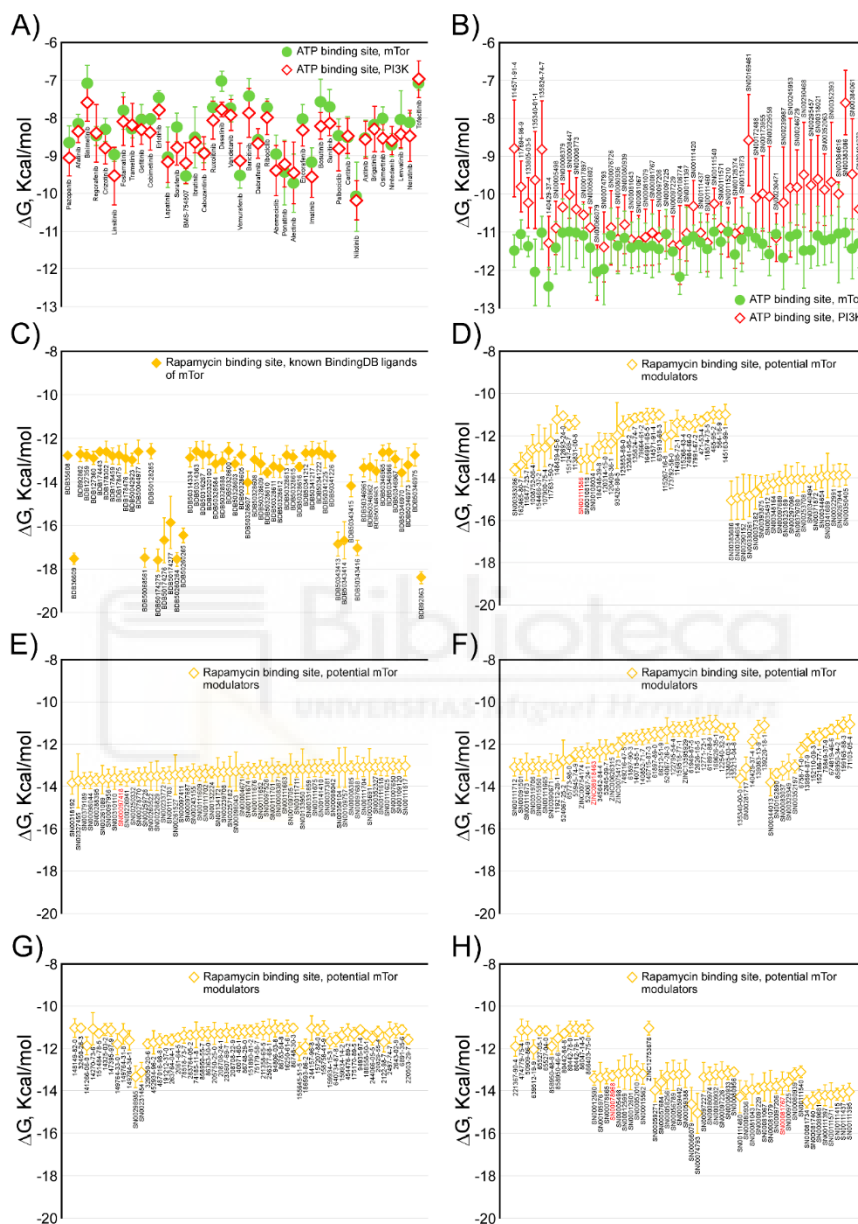
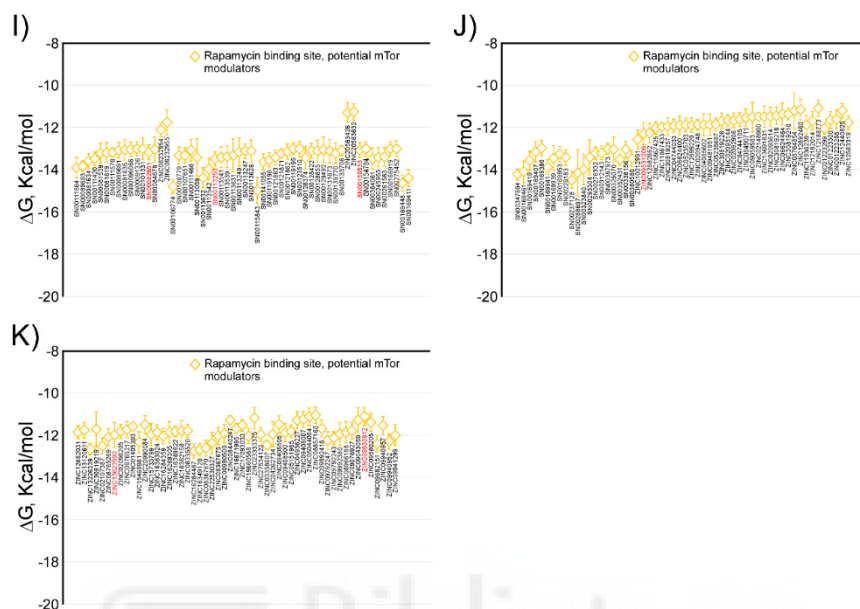
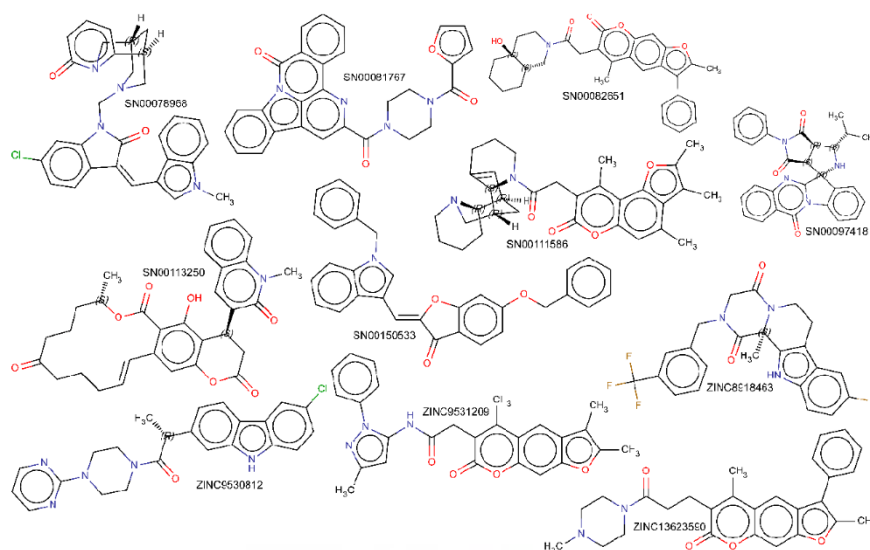


Figure 3. Cont.

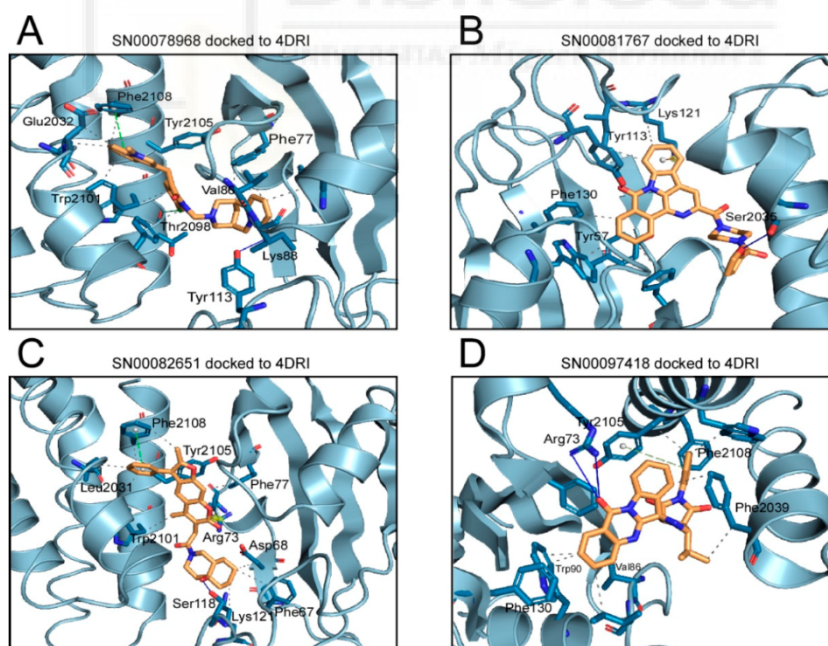


**Figure 3.** Comparison of the calculated Gibbs free energy variation ( $\Delta G$ ) for the selected inhibitor candidate compounds, against the ATP and rapamycin binding sites of the mTOR kinase. Panel (A) shows the calculated  $\Delta G$  values for forty compounds approved by the FDA, for clinical use against various types of cancer against the ATP binding site. Panel (B) shows the  $\Delta G$  values of the selected inhibitor candidate compounds against the ATP binding site of mTOR, and the same selected compounds against PI3K. Panel (C) shows the calculated  $\Delta G$  values for fifty-six compounds registered in the bindingDB as mTOR kinase modulators. Panels (D–K) show the  $\Delta G$  values of the selected inhibitor candidate compounds, against the rapamycin binding site of the mTOR. The common name (A), CAS number (for marine natural product compounds), Super Natural II, bindingDB (C), or ZINC names for all compounds, is indicated below each value, in black, except for the eleven compounds experimentally tested in this study (red color).

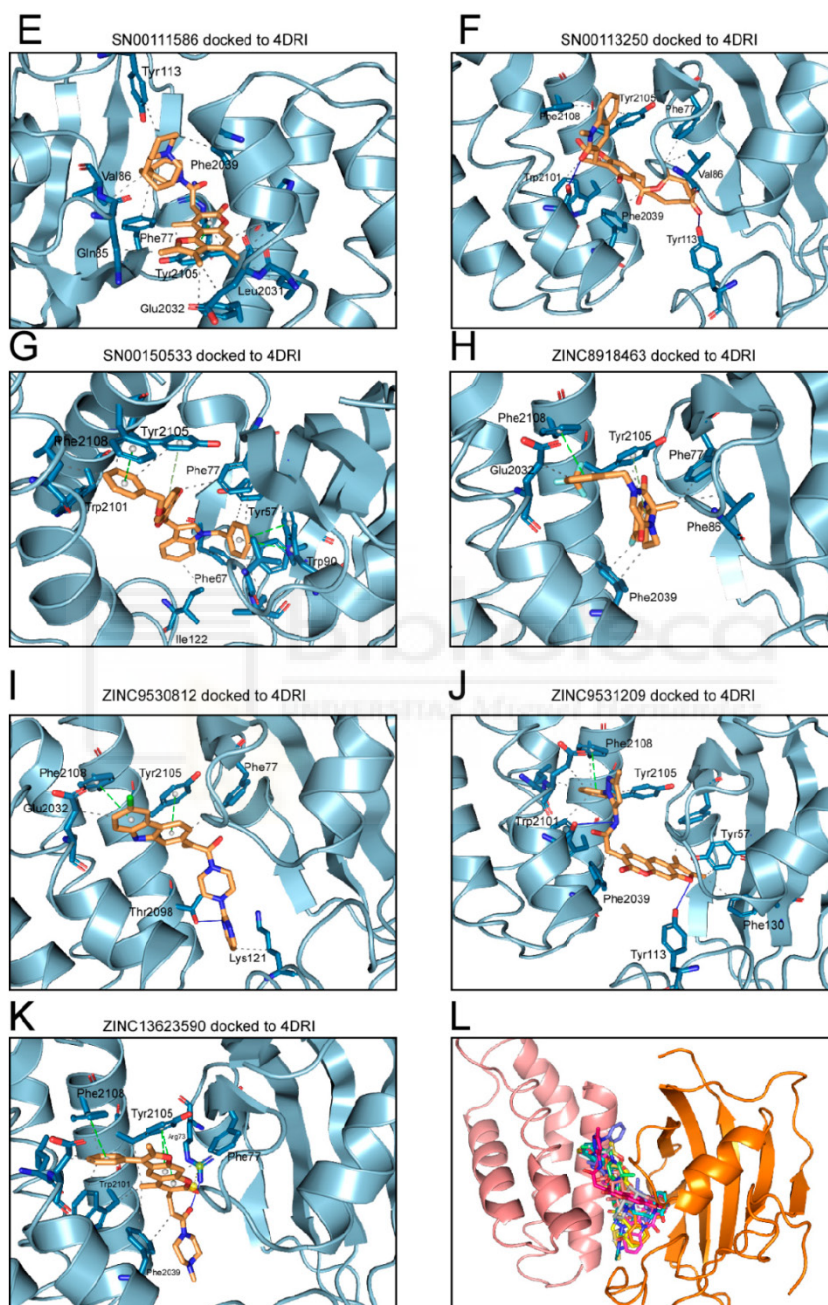
The Gibbs free energy variation ( $\Delta G$ ) is a representative value of the number and intensity of the atomic interactions, between the receptor (mTOR) and the docked compound [31]. The molecular docking of a protein target and the small ligand compounds predict the best interaction mode for a defined binding site. AutoDock/Vina, uses in its scoring function, the AMBER force field, which computes the terms of the contributions of van der Waals interactions, hydrogen bonding, electrostatic interactions, conformational entropy, and desolvation [30–32]. Figure 5 shows the molecular interactions between the amino acids of the rapamycin binding site and the inhibitor docked compounds. Details of the atoms involved in each type of interaction can be found in Supplementary Figure S1. In the interaction of each of the eleven compounds and the amino acids of the rapamycin binding site, hydrophobic interactions were predominant. In addition, most of the compounds that are able to establish hydrogen bonds and, in some cases, saline bridges, (SN00082651, ZINC13623590) were detected (Supplementary Figure S1).



**Figure 4.** Molecular structure of compounds selected against the allosteric rapamycin binding site of mTOR, and tested experimentally. The name assigned to each compound by the Super Natural II [28] or ZINC database [29], in each case, is close to each structure.



**Figure 5.** Cont.



**Figure 5.** Molecular docking analysis for the 11 selected compounds against the allosteric rapamycin binding site of mTOR, showing the interacting residues of the binding site and each type of molecular

interaction. Each panel of this figure has been prepared using the 4DRI structure of mTOR. For each compound docked to the protein, the pose with the lowest  $\Delta G$  value has been shown. The interactions have been detected with the Protein–Ligand Interaction Profiler (FLIP) algorithm [35]. In each panel the compound analyzed is indicated. Panel L shows the best pose superimposed for each of the eleven inhibitor compounds. The full details of the molecular interactions are shown as supplementary information.

## 2.2. Determination of the Cell Viability of HCT116 Cells after Treatment with Selected Inhibitor Candidate Compounds

Cellular cytotoxicity induced by the selected experimental compounds was evaluated by both the MTT cell viability assay and by counting the Hoechst-stained nuclei of the HCT116 human colon cancer cell line [36]. For the MTT cell viability assay (Figure 6), HCT116 cells were treated with a range of concentrations of each compound (0–20  $\mu\text{M}$ ). In parallel, treatments with equivalent amounts of the corresponding compound solvent Dimethyl sulfoxide (DMSO) were performed up to a maximum final concentration of 0.5% *v/v*. After 24 h, cell viability was determined by MTT as described in the “Materials and Methods” section [30]. Additionally, and to confirm that the compounds were not cytotoxic, a cell count was performed by taking microphotographs of the Hoechst-stained cells at 4x, using the 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) imaging filter cube [37] (see also Figure 6). As shown in Figure 6, HCT116 cells were sensitive to all compounds, including rapamycin, at a concentration of 20  $\mu\text{M}$ . At this concentration, cell viability, followed by both techniques, was decreased by 20% to 80%, depending on each tested compound. If we observed the cell viability data in the presence of concentrations no greater than 10  $\mu\text{M}$ , we can establish four groups of compounds. For the compound SN00078968, the maximum non-toxic concentration was 0.1  $\mu\text{M}$ , that for compound SN00097418 was 1  $\mu\text{M}$ , that for the compounds ZINC09531209, ZINC08918463, SN00081767, ZINC13623590, and ZINC09530812 was 5  $\mu\text{M}$ , and, finally, that for the compounds SN00111586, SN00150533, SN00082651, and SN00113250, concentrations higher than 10  $\mu\text{M}$  could not be used. Keeping in mind these maximum values of concentrations, for each compound that showed no cytotoxicity, they were then tested as potential mTOR inhibitors.

## 2.3. Determination of the Inhibitory Activity of the Selected Compounds against mTOR

Anti Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) Rabbit mAb detects P-Ser2848 in mTOR. mTOR was phosphorylated at Ser2448 via the PI3K/Akt signaling pathway [38], and was autophosphorylated at Ser2481 [39]. Therefore, P-Ser2481 could be considered a marker of the autokinase activity of mTOR. Proteolysis of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), by caspase, into an 89-kD fragment was utilized as a marker for apoptosis [40,41]. As shown in Figure 7, while PARP cleavage was clearly detected in HCT116 cells treated with 10  $\mu\text{M}$  rapamycin, which induced caspase-mediated apoptosis, only slight PARP cleavage was seen in the same cells treated with lower concentrations (see Figure 7A). As shown in Figure 7, the eleven compounds evaluated showed an inhibitory activity of mTOR, at the doses tested. The inhibition varied between 20% and 40%, with respect to the control, depending on each tested compound and dosage. All the compounds showed a percentage of inhibition, at the tested dose, representing approximately half of the percentage of inhibition that was achieved with the same dose of rapamycin.



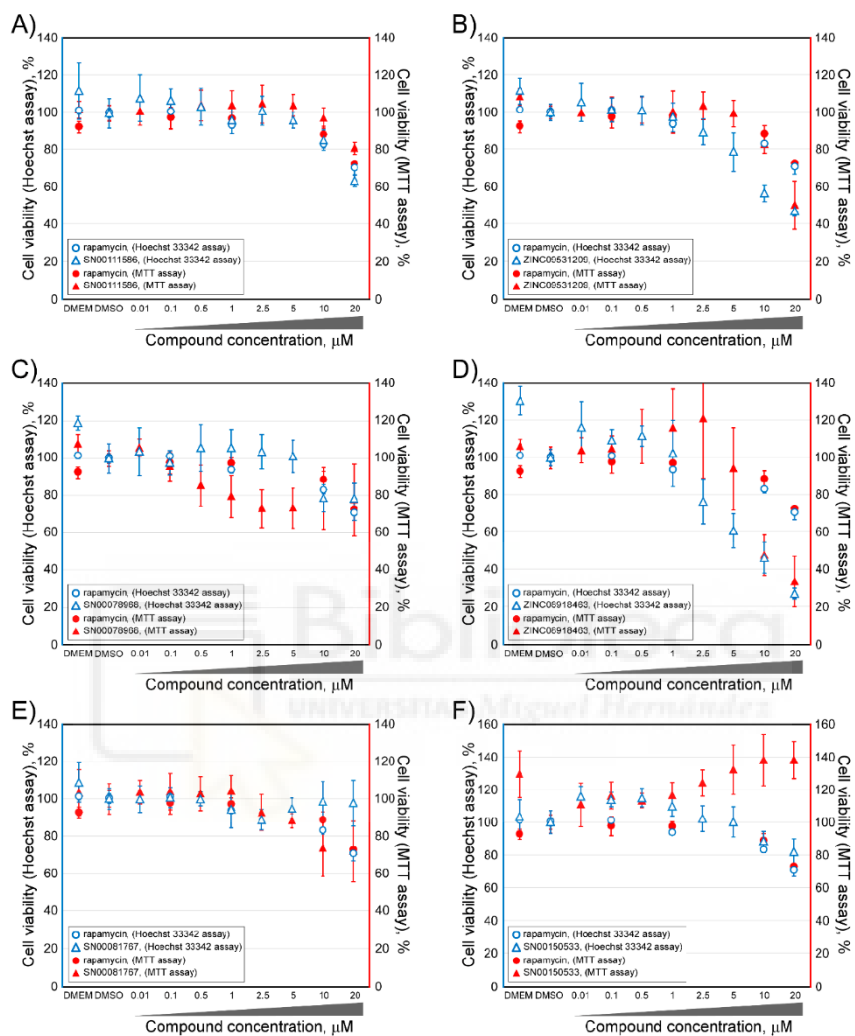
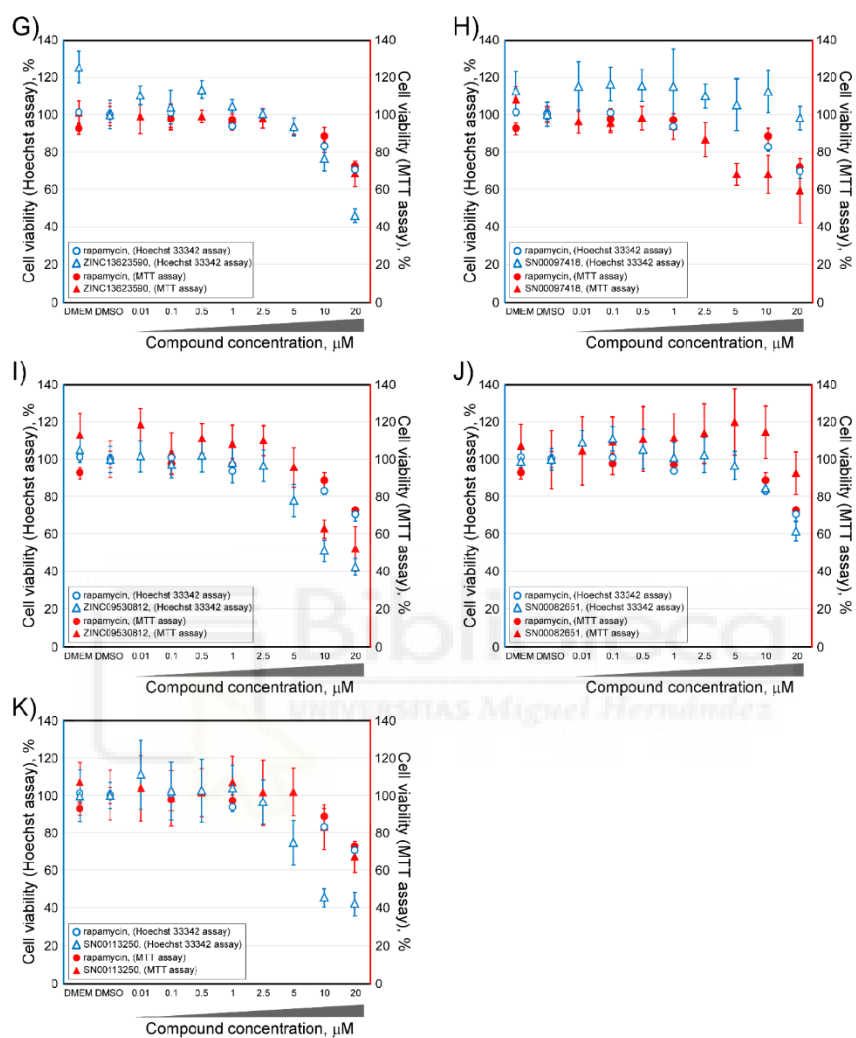
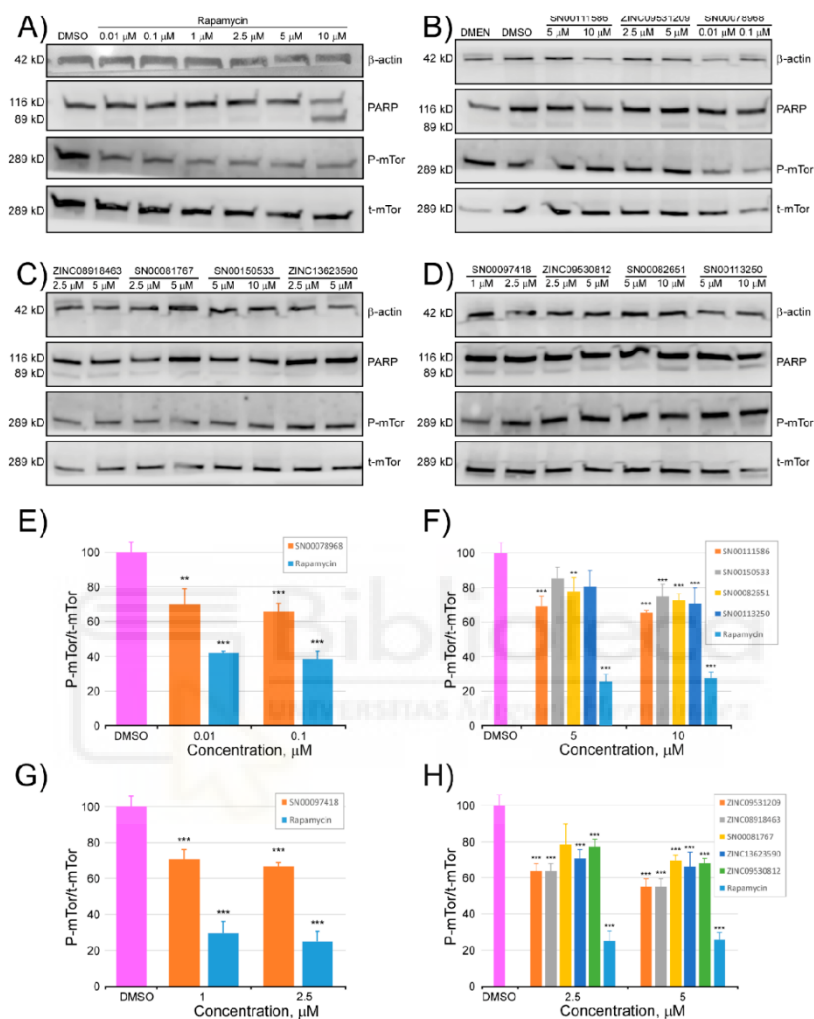


Figure 6. Cont.



**Figure 6.** Viability of HCT116 cells after treatment with selected inhibitor candidate compounds, against the mTOR rapamycin binding site, as measured by both the MTT assay (symbols in red color) and counting Hoechst stained-nuclei (symbols in blue color). Each compound was always compared with rapamycin in parallel experiments. Each panel included a legend with the compounds analyzed and methodology followed (MTT or Hoechst stained-nuclei). The values were normalized with respect to media cultured only Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

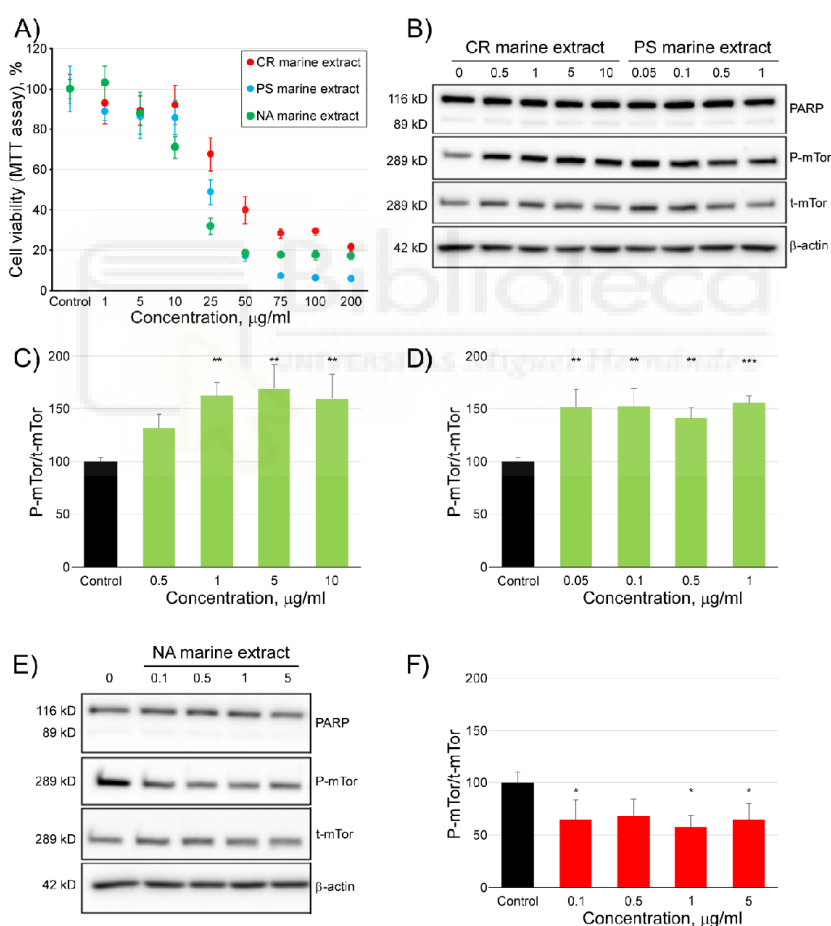


**Figure 7.** Inhibitory activity of selected compounds against the rapamycin binding site of mTOR. After incubation with different doses of all tested compounds and rapamycin or control medium (DMEM) and the compound vehicle (DMSO), for 24 h, HCT116 cells were lysed and subjected to Western blot analysis of total mTOR (t-mTor) and phosphorylated mTOR (P-mTor) antibodies (Panels (A–D)). Image quantification analysis of the Western blots presented as the ratio of P-mTor/t-mTor, in percentage, with respect to the control (DMSO) for the (E–H) panels. Levels of PARP (116 KDa) and cleaved-PARP (89 KDa) were detected by Western blotting.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. The experiment was repeated four times with similar results. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences compared with the control (DMSO).

#### 2.4. Modulating Effect of Three Marine Extracts on the Activity of mTOR

In addition to the strategy presented thus far in our study, based on the use of mTOR structural information to target to its ATP or rapamycin binding sites with small molecules of known structure,

we also used three marine extracts to check the modulatory activity of mTOR (Figure 8). As shown in Figure 8A, the viability in HCT116 cells did not decrease more than 10%, at concentrations of the extracts that did not exceed 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (CR extract), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PS extract), and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (NA extract). Therefore, those maximum concentrations were used to determine their effect on the activity of mTOR. Considering the absence of the 89-kDa fragment of PARP in the blots presented in panel B (CR and PS extracts) and panel E (NA extract), none of the three marine extracts, used at the indicated doses, induced apoptosis. Surprisingly, two of the marine extracts (CR and PS extracts, panels 8C and 8D, respectively) dramatically activated the mTOR activity, increasing the P-mTor/t-mTor ratio by more than 50%, with respect to the control. By contrast, the NA extract (Figure 8F) showed an inhibitory effect on the mTOR activity of a similar magnitude (40% decrease with respect to the control), to that described above, for the compounds selected based on molecular docking and ADMET profiling experiments.



**Figure 8.** Analysis of the modulatory activity of three marine extracts on the activity of mTOR. Panel (A) shows the viability of HCT116 cells, after treatment with marine extracts against mTOR, followed by the MTT assay. After incubation with different doses of all the tested marine extracts or control

[compound vehicle (DMSO)] for 24 h, HCT116 cells were lysed and subjected to the Western blot analysis of total mTOR (t-mTor) and phosphorylated mTOR (P-mTor) antibodies (Panels B,E). Image quantification analysis of the Western blots presented as the ratio P-mTor/t-mTor, in percentage, with respect to the control for the (Panels C,D,F). The levels of PARP (116 KDa) and cleaved-PARP (89 KDa) were also detected by Western blotting.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The experiment was repeated four times with similar results. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences compared with the control.

### 3. Discussion

Kinase proteins play a predominant regulatory role in cell biology because they can reversibly modify the activity of a protein, by increasing or decreasing its activity, which may involve the alteration of other biological activities. Additionally, the same kinases can be phosphorylated at different amino acids, and, in some cases, can be stimulators, while others can behave as inhibitors [24]. In the cell, protein kinases exist in the basal state and are only activated, when necessary, by very varied stimuli. Given their involvement in multiple functions of cell biology, the deregulation of their activity leads to important pathologies, such as cancer, aging, and inflammatory disorders. Thus, kinase proteins have become important pharmacological targets, and the development of inhibitory drugs is an important scientific and medical activity against human disease. Additionally, the constant appearance of mutations generates resistance to inhibitory drugs, representing a scientific challenge of the first order because of the health implications that this entails.

The resolved structure from the X-ray diffraction data of the catalytic domain of the protein kinases showed the existence of an N-ter lobe and another C-ter that formed a cleft which served as a binding site for ATP and  $Mg^{2+}$ . Most kinase inhibitor drugs have this cavity as a target, and this supposes a problem of specificity when it is necessary to selectively modify the enzymatic activity of a particular protein kinase and probably contributes to the development of side effects. To support this assertion, we have carried out molecular docking experiments against the ATP binding site of the catalytic domain of 12 protein kinase and have found the best docking for forty drugs approved by the FDA, for use as antineoplastic drugs. Supplementary Figure S6 show the calculated  $\Delta G$  (affinity) of the binding of these drugs to the ATP binding site. These values show that there are no significant differences for any of the molecules tested, with respect to their affinity for the ATP binding site in the twelve analyzed kinases. Thus, in our opinion, it would be more effective, from a therapeutic point of view, to develop inhibitors that target unique binding sites of each protein kinase. These regulatory sites, in many cases, have not yet been described. However, in the case of mTOR, the rapamycin binding site is known and allows specific inhibition of the mTORC1 complex, not the mTORC2 complex, which is insensitive to this drug.

Aiming to identify protein kinase targets that are different from the ATP binding site, we had, in our favor, that many kinases present modular domains (SH2, SH3) of temporary binding to other proteins or to themselves, especially, different sites of interaction with other proteins, that are involved in the formation of active complexes (this is the case of mTORC1 and mTORC2) or in the transmission of information in signaling cascades. In principle, the breakdown of any of these protein-protein interactions might be of therapeutic interest [42,43]. Although, in this work, we presented candidate compounds for mTOR inhibitors, targeted on the ATP binding site (Figure 3B and Supplementary Table S6), consistent with these ideas, we have only tested, in vitro, the inhibitory activity of those designed against the rapamycin binding allosteric site (Figure 3D–K and Supplementary Table S7).

In this study, we have presented up to a hundred and thirty-seven compounds of marine origin as candidates for inhibitors targeted to the rapamycin binding site. However, we could not test them all experimentally because of their lack of commercial availability. Although our group is making efforts to offer the scientific community information on the structures of marine natural compounds [27] (with more than 14,000 compounds) and there are also commercial databases available, such as MarinLit (<http://pubs.rsc.org/marinlit>) with more than 28,000 compounds in 2016, experimentation with pure compounds or enriched extracts is not easy. In our case, collaboration with the private sector allows access

to the marine extracts of various species, for which we must characterize their molecular composition and determine their possible biological effects. This is the case of the three marine extracts presented in this study that has enabled the discovery of two extracts with activating capacity and one with inhibitory capacity on the mTOR protein kinase. Marine environments are largely unexplored in their biodiversity, however, undoubtedly, they harbor a huge source of potentially bioactive compounds that will allow the development of new products of interest in the pharmaceutical, food, cosmeceutical, and chemical industries. Despite these difficulties, eight marine natural products have been approved by the FDA as drugs, five of them against cancer, and twelve currently in different phases of clinical trials [27,44].

The computer-aided drug design methods accumulate a long experience in the development of small molecules with therapeutic action and reduce costs compared with high-throughput experimental screening approaches alone [45]. The experimental data that we showed in this study were consistent with this statement. In our case, we have explored a chemical library of 484,527 compounds and have proposed 491 compounds (51 against the ATP binding site and 445 against the rapamycin binding site) as candidate compounds inhibitors of mTOR. Among these candidates, we chose eleven to test their *in vitro* activity, and all of them showed the inhibitory capacity of mTOR. In our opinion, much of this success was due to the strict definition of the suitable filters to select the candidate compounds. In particular, developing a filter based on the statistical behavior of the calculated physico-chemical and toxicological parameters (ADMET profile, see Figure 2), for compounds registered in the bindingDB database [33] as protein kinase modulators, has made the difference between success and failure.

In our study we presented compounds capable of reducing *in vitro* the activity of mTOR by 20% and 40% (Figure 7), while rapamycin reached 60%, at similar concentrations and in the same cellular system tested. We wondered about the possibility of these compounds being potential candidates for further preclinical studies. mTORC1 is rapamycin sensitive and acts as a major checkpoint that coordinates the balance between cell growth and autophagy [46]. The control of mTOR activity has interest in cancer [1], obesity [21], and aging [46,47]. At the time of writing this manuscript the search term 'rapamycin' generated 1972 results in the National Institutes of Health clinical trials database (<http://clinicaltrials.gov>). These data are indicative of the clinical interest in this drug and anticipates abundant scientific information on its desirable and adverse effects. However, available clinical trials indicate that the blocking of mTORC1 with rapalogs shows considerable adverse effects. In addition, mTORC1 is ubiquitously expressed, reducing its effectiveness to focused therapies [22]. The use of rapalogs has demonstrated the existence of abundant side effects—dermatological, metabolic, renal, hematological, and respiratory toxicities, among others [48,49]. Trials in preclinical cancer models are promising but their clinical use does not generate the expected results [50]. Several reasons may explain the limitations of targeting mTORC1 in cancer therapy—resistant mutations of mTOR, activation of alternate proliferative signaling pathways, and intratumoral heterogeneity of mTOR activity, among others [22].

Given this scenario, the answer to the previous question is necessarily affirmative. In the same sense and in relation to the association between the hyperactivation of mTOR and aging, the development of new molecules that partially inhibit this kinase has an interest not only in basic science but also as possible therapeutic applications. The exhaustion of stem cells in their tissues of origin is considered the primary cause of aging. This is understood as the functional decline of cells/organs or the accumulation of damage, and is induced by various mechanisms, including the increased expression of inhibitory factors of the cell cycle or DNA damage, among others [51]. There is still much to learn about the molecular mechanisms that lead to aging, but the implication of changes in different signaling pathways with aging, is known and includes TGF- $\beta$ , p38 MAPK, JAK/STAT, Delta/Notch, PI3K, and, of course mTOR, which represents a point of interconnection between these ways [47]. Various evidence has maintained that like caloric restriction, without reaching malnutrition, inhibition of mTORC1 can have similar beneficial effects on several pathologies related to age in rodents, and in some cases, humans [47]. The existing scientific evidence shows that inhibition of

mTORC1 with rapamycin is currently the only pharmacological treatment that increases lifespan in all model organisms studied—invertebrates, yeasts or rodents [52]. Progress on this matter allows us to be optimistic about the possibilities of finding the mechanisms to delay human aging. Nevertheless, precautions must be taken because many side effects are associated with the use of rapalogs, thus, research on this direction should be promoted in the discovery of new mTOR inhibitors.

Finally, although the main purpose of our study was focused on finding mTOR inhibitors, we have also found two marine extracts with *in vitro* activating activity of this kinase (Figure 8B–D). In the literature, few chemical activators of mTOR have been described [53,54]. Oxidized low-density lipoprotein inhibits mTOR and induces autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells, which play very critical roles in cardiovascular homeostasis [54]. CR and PS extracts increase the activity of mTOR in a proportion similar to compound 3BDO [54] and do not induce apoptosis. Our laboratory studies the characterization of its chemical composition and its effects on different cell types (manuscript in preparation).

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Protein Structures of Human mTOR and PI3K Proteins and Chemical Libraries for Molecular Docking

By now, various crystal structures of the mTOR protein (UniProt P42345) have been resolved and deposited in the Protein Data Bank. This has enabled the exploration of both the ATP binding site (4JSN, 4JSP, 4JSV, 4JSX, 4JT5, 4JT6, 5WBU, 5WBY) and rapamycin binding site (1FAP, 1NSG, 2FAP, 3FAP, 4FAP, 5GPG, 4DRH, 4DRI, 4DRJ), in molecular docking experiments, in which we use all available structures. The virtual screening of ligands is more reliable if the flexibility of the receptor protein is considered. Thus, we have used multiple crystallographic receptor conformations to perform the molecular docking experiments [55]. The molecular docking experiments on the catalytic site of PI3K (UniProt P48736) have been carried out on the twenty-four (1E8Y, 6AUD, 4ANV, 3L54, 4WWO, 4ANW, 4HVB, 1E8Z, 3ENE, 4WWP, 3LJ3, 4GB9, 5G55, 4FUL, 5JHB, 2CHX, 2V4L, 3R7Q, 3T8M, 3ZVV, 5JHA, 3APC, 3APD, and 3ML9) resolved structures from X-ray data available in the Protein Data Bank.

Molecular docking experiments allow virtual screening of potentially modulating ligands of a given target because they prioritize certain compounds to be experimentally tested. Therefore, in these experiments, they require mining of long collections of chemical compounds. We have used a library of marine natural products (14,442 compounds) [27], ZINC natural products (144,766 compounds) [29] (<http://zinc.docking.org/browse/catalogs/natural-products>), and the SuperNatural II database (325,319 compounds) [28]. The 3D structures in the sdf format of all compounds tested are available at <http://docking.umh.es/downloaddb> (Chemical libraries: 2 for Super Natural II, 7 for marine natural products, and 8 for ZINC natural products) [30–32]. Mol2 files were converted to the pdbqt format, using the Python script “prepare\_ligand4.py”, included into the AutodockTools-1.5.7.rc1 [56].

##### 4.2. Molecular Docking Procedure

Before starting the molecular docking procedure, all structures of both the mTOR and the PI3K (see above for the PDB code) were submitted to geometric optimization, using the repair function of the FoldX algorithm [57]. To perform docking with AutoDock/Vina software v1.1.2 [58], the receptor and ligand structures were transformed to the pdbqt file format, which included atomic charges, atom-type definitions, and for the ligands, the topological information (rotatable bonds) [31,32]. A grid with dimensions of  $23 \times 23 \times 23$  points was centered to the co-crystallized ligands to ensure the coverage of the binding site of the structure. AutoDock/Vina was set up on a Linux cluster at lusitania2.cenit.es Linux cluster (Research, Technological Innovation and Supercomputing Center of Extremadura [CenitS]). AutoDock/Vina generated a conformer docked to the binding site in the protein, for each tested ligand, and calculated the Gibbs free energy variation of the binding process. Compounds with lower  $\Delta G$  (kcal/mol) outperformed a first screening filter, as potential candidates for inhibitors [31,32].

#### 4.3. Calculation of the Pharmacokinetic Parameters and Potential Toxicity Properties of the Inhibitor Candidates

Physicochemical parameters for the best docked compounds were calculated, as described previously [31,32], using DataWarrior v4.7.2 software (Allschwil, Switzerland) [59]. The ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties were calculated using the admetSAR [60] web application and the DataWarrior v4.7.2 [59].

#### 4.4. Chemical Compounds against mTOR Kinase Activity

The compounds with the SuperNatural II IDs SN00097418, SN00078968, SN00082651, SN00111586, SN00081767, SN00150533, SN00113250; and ZINC database IDs ZINC09531209, ZINC13623590, ZINC08918463, ZINC09530812 were purchased from the chemical supplier MolPort (supplier references MolPort-005-910-351, MolPort-000-853-506, MolPort-006-316-888, MolPort-000-849-049, MolPort-002-535-101, MolPort-002-649-206, MolPort-028-854-639, MolPort-000-853-173, MolPort-002-672-346, MolPort-002-523-849, MolPort-005-913-128, respectively), at <https://www.molport.com/>.

#### 4.5. Preparation of Marine Extracts

Based on observations of inter and intra-specific competition in experimental aquariums and searches on bibliographic bases, four species of marine invertebrates were chosen for their potential as producers of compounds with anticancer potential. The selected species were composed of one soft coral (CR from *Carotacyon* sp.), one nudibranch (NA from *Phyllidia varicosa*), and one holothurian (PS from *Pseudocholochirus violaceus*), and were obtained from the distributor company of marine species, Todo Pez S.L., Alicante, Spain.

#### 4.6. Cell Culture and Treatment

Rapamycin and MTT were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium, penicillin-streptomycin, fetal bovine serum and 0.05x trypsin/ethylene diamine tetra acetic acid was purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

The human colorectal carcinoma cell line HCT116 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin and 100 g/mL of streptomycin. Cells were incubated at 37 °C, in a humidified atmosphere, containing 5%/95% of CO<sub>2</sub>/air.

#### 4.7. Cytotoxicity Assays

Cells were plated in 96-multiwell culture plates, at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well. After 24 h of incubation with the crude extract, MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/mL and was incubated for 3 h. Next, the medium was removed, and the formazan crystals were dissolved in DMSO. Absorbance was measured at 490 nm, subtracted at 670 nm in a microplate reader (SPECTROstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Germany). OD values were expressed in percentages relative to the control group, consisting of untreated cells. Cell viability was calculated by the formula:  $100 \times (\text{treated-cell absorbance} / \text{control-cell absorbance})$ . All experiments were performed in triplicate, and the results were shown as the means with SD, calculated from three different experiments.

#### 4.8. Quantification of the Total mTOR and Phosphor-mTOR Levels

After treatment, the cells were lysed with a lysis buffer—radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA Buffer) (BioRad Laboratories Inc., Madrid, Spain), for 60 min at  $-20$  °C. The lysate was centrifuged at 13,200 rpm for 20 min; the protein concentration in the supernatant was spectrophotometrically determined using the Thermo Scientific Pierce Kit (Waltham, MA, USA) (BCA Protein assay kit), at 562 nm. Protein samples were diluted with the loading buffer (0.5 M Tris HCl



at pH 6.8, 10% glycerol, 10% w/v SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.05% w/v bromophenol blue) and then were boiled for 5 min. Proteins (30  $\mu$ g/lane) and prestained standards (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were loaded onto 4%–15% SDS precast polyacrylamide gels (BioRad Laboratories Inc., Madrid, Spain).

After electrophoresis, the resolved proteins were transferred from the gel to nitrocellulose membranes. A blotting buffer (20 mM Tris/150 mM glycine, pH 8, 20% v/v methanol) was used for the gel and for membrane saturation and blotting. The transblotted membranes were washed thrice with Tris buffered saline (TBS), containing 0.05% Tween 20 (TBST). After blocking with TBS containing 5% non-fat milk, for 60 min, the membranes were incubated with the appropriate primary antibodies (PARP Antibody #9542, Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP Rabbit mAb #5536 and mTOR Antibody #2972) (Cell Signaling Technology Inc. Beverly, MA, USA) at 1:1000 dilution (with the exception of anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), at 1:4000) in TBST–5% low fat milk at 4 °C overnight. The membranes were washed three times with TBST (15 min each) and then were incubated with the secondary antibody anti-human PARP, Phospho-mTOR and mTOR 1:2000, horseradish peroxidase (HRP)-conjugate (Cell Signaling Technology Inc., Barcelona, Spain), for 3 h. The bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Licor; Lincoln, NE, USA).

#### 4.9. Statistical Analysis

Values are represented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The values were subjected to statistical analysis (one-way ANOVA, and Tukey's test for multiple comparisons/non-parametric approaches). The differences were considered to be statistically significant at  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  on the bars, indicate statistically significant differences, compared to the control, unless otherwise stated. All cellular measurements were performed in four-fold, unless otherwise specified.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/10/385/s1>, Supplementary Table S1: Physicochemical and toxicological parameters calculated for the selected compounds against the ATP binding site of mTOR based on molecular docking analysis. Supplementary Table S2: Physicochemical and toxicological parameters calculated for the selected compounds against the rapamycin binding site of mTOR based on molecular docking analysis. Supplementary Table S3: Molecular docking analysis for potential inhibitor compounds (candidate molecules) at the rapamycin binding site of mTOR kinase selected among Marine Natural Products. Supplementary Table S4: Molecular docking analysis for potential inhibitor compounds (candidate molecules) at the rapamycin binding site of mTOR kinase selected among Super Natural II database. Supplementary Table S5: Molecular docking analysis for potential inhibitor compounds (candidate molecules) at the rapamycin binding site of mTOR kinase selected among ZINC database natural products. Supplementary Table S6: Molecular docking analysis for potential inhibitor compounds (candidate molecules) at the ATP binding site of mTOR kinase selected among Marine Natural Products. Supplementary Table S7: Molecular docking analysis for potential inhibitor compounds (candidate molecules) at the ATP binding site of mTOR kinase selected among Super Natural II database. Supplementary Figure S1: Detailed description of the molecular interactions between the inhibitor compound and the rapamycin binding site in mTOR. Supplementary Figure S2: Comparison of the Gibbs free energy variation ( $\Delta G$ , kcal/mol) for 40 compounds approved by the FDA for clinical use against various types of cancer, obtained by molecular docking experiments against the ATP binding site of 12 protein kinases.

**Author Contributions:** V.M., M.H.-L., E.B.-C., and J.A.E. conceived and designed the experiments and J.A.E. wrote the paper; V.R.-T., M.L.-E., E.B.-C. and M.H.-L. conducted the in vitro experiments; V.G. and J.A.E. conducted the in silico molecular docking experiments and other computational approaches; V.M. and J.A.E. have been responsible for funding acquisition. All authors contributed to the general discussion of the manuscript. All authors contributed toward data analysis, drafting and revising the paper and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Funding:** This work was supported by AGL2011-29857-C03-03 and IDI-20120751 grants (Spanish Ministry of Science and Innovation), projects AGL2015-67995-C3-1-R, AGL2015-67995-C3-2-R and AGL2015-67995-C3-3-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO); and PROMETEO/2012/007, PROMETEO/2016/006, ACOMP/2013/093, ACIF/2010/162, ACIF/2015/158 and ACIF/2016/230 grants from Generalitat Valenciana and CIBER (CB12/03/30038, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III).

**Acknowledgments:** We are grateful to Research, Technological Innovation and the Supercomputing Center of Extremadura (CenITs) for allowing us to use their supercomputing facilities (LUSITANIA II). We also thank the company “TodoPez, S.L., Alicante, Spain” the generous provision of marine extracts.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Chiarini, F.; Evangelisti, C.; McCubrey, J.A.; Martelli, A.M. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 124–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yang, H.; Rudge, D.G.; Koos, J.D.; Vaidialingam, B.; Yang, H.J.; Pavletich, N.P. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **2013**, *497*, 217–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hara, K.; Maruki, Y.; Long, X.; Yoshino, K.-I.; Oshiro, N.; Hidayat, S.; Tokunaga, C.; Avruch, J.; Yonezawa, K. Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell* **2002**, *110*, 177–189. [[CrossRef](#)]
- Sarbassov, D.D.; Guertin, D.A.; Ali, S.M.; Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **2005**, *307*, 1098–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ieranò, C.; Santagata, S.; Napolitano, M.; Guardia, F.; Grimaldi, A.; Antignani, E.; Botti, G.; Consales, C.; Riccio, A.; Nanayakkara, M.; et al. CXCR4 and CXCR7 transduce through mTOR in human renal cancer cells. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McCubrey, J.A.; Steelman, L.S.; Chappell, W.H.; Abrams, S.L.; Wong, E.W.; Chang, F.; Lehmann, B.; Terrian, D.M.; Milella, M.; Tafuri, A.; et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1263–1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Laplante, M.; Sabatini, D.M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* **2012**, *149*, 274–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Inoki, K.; Ouyang, H.; Zhu, T.; Lindvall, C.; Wang, Y.; Zhang, X.; Yang, Q.; Bennett, C.; Harada, Y.; Stankunas, K.; et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **2006**, *126*, 955–968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Anastasiou, D. Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape. *Br. J. Cancer* **2016**, *116*, 277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Balgi, A.D.; Diering, G.H.; Donohue, E.; Lam, K.K.; Fonseca, B.D.; Zimmerman, C.; Numata, M.; Roberge, M. Regulation of mTORC1 signaling by pH. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arsham, A.M.; Howell, J.J.; Simon, M.C. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29655–29660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cho, J.H.; Han, J.S. Phospholipase D and Its Essential Role in Cancer. *Mol. Cells* **2017**, *40*, 805–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yoon, M.S.; Rosenberger, C.L.; Wu, C.; Truong, N.; Sweedler, J.V.; Chen, J. Rapid mitogenic regulation of the mTORC1 inhibitor, DEPTOR, by phosphatidic acid. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 549–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thoreen, C.C.; Chantranupong, L.; Keys, H.R.; Wang, T.; Gray, N.S.; Sabatini, D.M. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **2012**, *485*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yuan, H.X.; Xiong, Y.; Guan, K.L. Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 379–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hosokawa, N.; Hara, T.; Kaizuka, T.; Kishi, C.; Takamura, A.; Miura, Y.; Iemura, S.; Natsume, T.; Takehana, K.; Yamada, N.; et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1981–1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dodd, K.M.; Yang, J.; Shen, M.H.; Sampson, J.R.; Tee, A.R. mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* **2014**, *34*, 2239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shimobayashi, M.; Hall, M.N. Making new contacts: The mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Comu, M.; Albert, V.; Hall, M.N. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2013**, *23*, 53–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vucenik, I.; Stains, J.P. Obesity and cancer risk: Evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1271*, 37–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Cai, H.; Dong, L.Q.; Liu, F. Recent Advances in Adipose mTOR Signaling and Function: Therapeutic Prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 303–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Faes, S.; Demartines, N.; Dormond, O. Resistance to mTORC1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Kinase Mutations to Intratumoral Heterogeneity of Kinase Activity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1726078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Malley, C.O.; Pidgeon, G.P. The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials. *BBA Clin.* **2016**, *5*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Roskoski, R., Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Benjamin, D.; Colombi, M.; Moroni, C.; Hall, M.N. Rapamycin passes the torch: A new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rodrik-Outmezguine, V.S.; Okaniwa, M.; Yao, Z.; Novotny, C.J.; McWhirter, C.; Banaji, A.; Won, H.; Wong, W.; Berger, M.; de Stanchina, E.; et al. Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature* **2016**, *534*, 272–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ruiz-Torres, V.; Encinar, J.A.; Herranz-Lopez, M.; Perez-Sanchez, A.; Galiano, V.; Barrajon-Catalan, E.; Micol, V. An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. *Molecules* **2017**, *22*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Banerjee, P.; Erehman, J.; Gohlke, B.O.; Wilhelm, T.; Preissner, R.; Dunkel, M. Super Natural II—a database of natural products. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D935–D939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sterling, T.; Irwin, J.J. ZINC 15—Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2324–2337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bello-Perez, M.; Falco, A.; Galiano, V.; Coll, J.; Perez, L.; Encinar, J.A. Discovery of nonnucleoside inhibitors of polymerase from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *12*, 2337–2359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Encinar, J.A.; Fernandez-Ballester, G.; Galiano-Ibarra, V.; Micol, V. In silico approach for the discovery of new PPARgamma modulators among plant-derived polyphenols. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 5877–5895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Galiano, V.; Garcia-Valtanen, P.; Micol, V.; Encinar, J.A. Looking for inhibitors of the dengue virus NS5 RNA-dependent RNA-polymerase using a molecular docking approach. *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 3163–3181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gilson, M.K.; Liu, T.; Baitaluk, M.; Nicola, G.; Hwang, L.; Chong, J. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1045–D1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guo, Q.; Yu, C.; Zhang, C.; Li, Y.; Wang, T.; Huang, Z.; Wang, X.; Zhou, W.; Li, Y.; Qin, Z.; et al. Highly Selective, Potent, and Oral mTOR Inhibitor for Treatment of Cancer as Autophagy Inducer. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 881–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V.J.; Adasme, M.F.; Schroeder, M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W443–W447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rajput, A.; Dominguez San Martin, I.; Rose, R.; Beko, A.; Levea, C.; Sharratt, E.; Mazurchuk, R.; Hoffman, R.M.; Brattain, M.G.; Wang, J. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *J. Surg. Res.* **2008**, *147*, 276–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cádiz-Gurrea, M.d.l.L.; Olivares-Vicente, M.; Herranz-López, M.; Arraez-Roman, D.; Fernández-Arroyo, S.; Micol, V.; Segura-Carretero, A. Bioassay-guided purification of Lippia citriodora polyphenols with AMPK modulatory activity. *J. Funct. Foods* **2018**, *46*, 514–520. [[CrossRef](#)]
38. Nave, B.T.; Ouwens, M.; Withers, D.J.; Alessi, D.R.; Shepherd, P.R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: Identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* **1999**, *344 Pt 2*, 427–431. [[CrossRef](#)]
39. Peterson, R.T.; Beal, P.A.; Comb, M.J.; Schreiber, S.L. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7416–7423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Edinger, A.L.; Thompson, C.B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 663–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jin, L.; Wang, W.; Fang, G. Targeting protein-protein interaction by small molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 435–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ivanov, A.A.; Khuri, F.R.; Fu, H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 393–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pereira, F.; Aires-de-Sousa, J. Computational Methodologies in the Exploration of Marine Natural Product Leads. *Mar. Drugs* **2018**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nantasenam, C.; Prachayasittikul, V. Maximizing computational tools for successful drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10*, 321–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kapahi, P.; Chen, D.; Rogers, A.N.; Katewa, S.D.; Li, P.W.; Thomas, E.L.; Kockel, L. With TOR, less is more: A key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab.* **2010**, *11*, 453–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Johnson, S.C.; Rabinovitch, P.S.; Kaeberlein, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **2013**, *493*, 338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sadowski, K.; Kotulska, K.; Jozwiak, S. Management of side effects of mTOR inhibitors in tuberous sclerosis patients. *Pharmacol. Rep.* **2016**, *68*, 536–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Pallet, N.; Legendre, C. Adverse events associated with mTOR inhibitors. *Expert Opin. Drug Saf.* **2013**, *12*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Li, J.; Kim, S.G.; Blenis, J. Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 373–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Neves, J.; Sousa-Victor, P.; Jasper, H. Rejuvenating Strategies for Stem Cell-Based Therapies in Aging. *Cell Stem Cell* **2017**, *20*, 161–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Weichhart, T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology* **2018**, *64*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ge, D.; Han, L.; Huang, S.; Peng, N.; Wang, P.; Jiang, Z.; Zhao, J.; Su, L.; Zhang, S.; Zhang, Y.; et al. Identification of a novel mTOR activator and discovery of a competing endogenous RNA regulating autophagy in vascular endothelial cells. *Autophagy* **2014**, *10*, 957–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Peng, N.; Meng, N.; Wang, S.; Zhao, F.; Zhao, J.; Su, L.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Zhao, B.; Miao, J. An activator of mTOR inhibits oxLDL-induced autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells and restricts atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bottegoni, G.; Rocchia, W.; Rueda, M.; Abagyan, R.; Cavalli, A. Systematic exploitation of multiple receptor conformations for virtual ligand screening. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Schymkowitz, J.; Borg, J.; Stricher, F.; Nys, R.; Rousseau, F.; Serrano, L. The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W382–W388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sander, T.; Freyss, J.; von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 460–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P.W.; Tang, Y. admetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).