

BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES CON PROPIEDADES ANTINEOPLÁSICAS EN LA FLORA MEDICINAL CUBANA: *XANTHIUM STRUMARIUM* L., Y EL PAPEL DE LAS XANTATINAS EN SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL

AUTORES PRINCIPALES: DraC. Janet Piloto Ferrer¹ y DrC. Angel Sánchez Lamar²

OTROS AUTORES: MSc. Alberto Ramos Ruiz¹, Lic. Ángel Vizoso Parra¹, MSc. Arilia García López¹, Lic. Marbelis Francisco Fernández¹, Téc. María L. González Sanabria¹, MSc. Antonia Remigio Montero¹, Lic. Aylema Romero³, DrC. Nelsón Merino⁴, MSc. Guillermo Aparicio⁴, Lic. Odalys Valdés⁴, Téc. Evelyn Spence⁴, Téc. Carlos Rodríguez Ferrada⁵, MSc Carlos Pérez⁶, DraC. Idania Rodeiro⁷.

COLABORADORES: DrC. Mario Fiore⁸, DraC. Francesca Degrassi⁸, DrC. Enrico Cundari⁸, DrC. Pasquale Stano⁹, DrC. Renata Cozzi⁹, DrC. Tommaso Cornetta⁹, DraC. Daniela Tofani⁹, DrC. Iris Catiana Zampini¹⁰, DrC. Ana Soledad Cuello¹⁰, DrC. María Inés Isla¹⁰, DrC. Thomas Stoiber¹¹

UNIDAD EJECUTORA DEL RESULTADO: CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS (CIDEM), Avenida 26, No. 1605 e/ Puentes Grandes y Boyeros, La Habana, Cuba

FILIACIÓN DE LOS AUTORES Y COLABORADORES:

1. Laboratorio de Genética Toxicológica, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Cuba
2. Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
3. Laboratorio de Análisis químico, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Cuba.
4. Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Cuba.
5. Estación Experimental de Plantas Medicinales “ Juan T. Roig” Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Cuba
6. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón” (ICBP-UCMH), Cuba

7. Centro de Bioactivos Marinos (CEBIMAR), Cuba
8. Istituto di Biologia e Patologia Molecolare, CNR, Roma, Italia.
9. Dipartimento di Biologia, Università "Roma TRE", Roma, Italia.
10. Facultad de Ciencias Naturales, IML, Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina. INQUINOA (UNT-CONICET).
11. Department of Molecular Cytology, Institute of Molecular Biotechnology, Hena, Germany.

AUTOR PARA LA COPRRESPONDENCIA:

DraC. Janet Piloto-Ferrer, Centro de Investigación y desarrollo de Medicamentos, (CIDEM),

Dirección: Avenida 26, No. 1605 e/ Puentes Grandes y Boyeros, La Habana, Cuba. CP.10400

E-mail:

janet.piloto@cidem.cu,

RESUMEN

Los últimos avances en la biología molecular y la medicina han logrado mejoras incalculables en la comprensión del cáncer. Sin embargo, éste sigue siendo una de las amenazas que responden a una elevada mortalidad. Una contribución a la quimioterapia del cáncer ha sido la aportada por los metabolitos secundarios de las plantas que han jugado un papel importante en los últimos años. Cuba tiene una inmensa flora y una gran tradición popular en el uso de la medicina verde, no obstante, su flora medicinal ha sido poco investigada como fuente de compuestos capaces de inhibir la proliferación de las células cancerígenas. Por tanto, explorar el reino de las plantas para el descubrimiento de nuevas moléculas en la terapia anti-cáncer, es un esfuerzo necesario y pertinente en la actualidad. Con este fin, la búsqueda de tales entidades en la flora medicinal y la caracterización antitumoral de una de las especies promisorias, puede constituir un aporte concreto que propiciará candidatos para su futura inclusión en la clínica. En la primera etapa de la investigación, se seleccionaron 78 especies de la flora medicinal cubana que según la farmacología experimental tenían demostrado actividades antiparasitaria, antifúngica, abortiva, antitumoral o toxicidad sistémica. De las mismas, se identificaron a seis especies con potencialidades antimitóticas y se demostró que, entre ellas, *X. strumarium* ocupó uno de los lugares primarios por su elevada eficacia en: interactuar con la tubulina, afectar el ensamblaje de los microtúbulos de células en división e interferir la dinámica del huso mitótico. Tal acción impidió el tránsito de metafase a anafase durante la mitosis y condujo a la muerte celular apoptótica. Al caracterizar el perfil antitumoral de esta especie en células tumorales de carcinoma de colon (CT26WT), se demostró la

capacidad de reducir el tamaño del tumor implantado en ratones e impedir la metástasis. Finalmente se identificó que las xantatinas, sintetizadas por esta planta, son responsables del mecanismo descrito, lo que avala la propuesta de tales fitocompuestos como candidatos farmacológicos. Estos hallazgos develan por primera vez las potencialidades de varias especies de uso medicinal como fuente de agentes antiproliferativos y la identidad del principal blanco celular de la acción de *X. strumarium* L., aportando un conjunto de conocimientos sobre las bases moleculares y celulares que contribuyen a explicar el amplio efecto antineoplásico en modelos preclínicos de cáncer. Los resultados propuestos contribuyen al cumplimiento de una de las líneas priorizadas de trabajo del Ministerio de Salud Pública: “avaluar científicamente el uso de plantas medicinales cubanas”; y tributan a los servicios de salud por aliviar una dolencia de alto impacto en nuestra sociedad. Ellos han sido presentados y defendidos, exitosamente, a través de: 24 artículos científicos publicados en importantes revistas de visibilidad internacional, la defensa de dos tesis de diploma, dos de maestría y un doctorado, así como, en 23 trabajos presentados en eventos científicos (18 internacionales y 5 nacionales). También han sido objeto de conferencias magistrales en instituciones universitarias extranjeras (Universidad Sapienza y Tercera Universidad de Roma, Universidad de Viterbo, Universidad de San Miguel de Tucumán, Argentina y Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil). A su vez, han sido objeto del "Premio Anual de Ciencia e Innovación Tecnológica del CIDEM, y el Premio Anual de la salud 2017 en la categoría artículo científico. Por último, cabe destacar que este logro ha sido posible gracias a la colaboración entre instituciones cubanas (CIDEM y UH) y extranjeras (Alemania, Italia, Argentina y Brasil), las cuales han aunado esfuerzos en la ejecución de cuatro proyectos internacionales.

COMUNICACIÓN CORTA

INTRODUCCIÓN

El cáncer comprende un amplio y complejo grupo de enfermedades, caracterizadas por mutaciones y/o alteraciones, que conducen a la destrucción de los procesos fisiológicos de las células, y provocan una proliferación autónoma, anárquica, progresiva y, finalmente, destructiva (Kumar y cols. 2014). A nivel mundial, representa la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en los países en vías de desarrollo, donde su incidencia continúa en aumento (Umar y cols. 2012). En Cuba, constituye la segunda causa de muerte antecedidas por las enfermedades del corazón. El total de defunciones en el año 2015 por tumores malignos fue de 24 131 con una tasa de 218.3 por cada 100 000 habitantes, con un incremento de 283 defunciones con respecto al año 2014 (Anuario-Estadístico 2016). Muchos de los quimioterapéuticos usados hoy en la clínica son ciclo celular-específicos, los cuales, inducen apoptosis, que es lo esperado como respuesta al tratamiento (Lee y Schmitt 2003). Basado en su modo de acción, estos compuestos pueden actuar sobre el ADN o sobre el aparato mitótico y aunque, han demostrado evidencias farmacológicas en la clínica, los efectos colaterales y la resistencia ocasionada, limitan en parte su efectividad (Jordan y Wilson 2004, Schmidt y Bastians 2007, Dumontet y Jordan 2010, Domenech y Malumbres 2013, Mukhtar y cols. 2014). Actualmente, más de la

mitad de las fármacos disponibles se obtienen a partir de productos naturales o se encuentran relacionados con ellos; así, en el caso del cáncer la proporción sobrepasa el 60% (Cragg y Pezzuto 2015). Adicionalmente, compuestos naturales de diversas estructuras, aislados de las plantas han sido considerados compuestos líderes o cabezas de serie y su modificación estructural ha permitido el desarrollo de compuestos con actividad farmacológica y con potencialidades terapéuticas efectivas (Gordaliza 2007). De esta forma una búsqueda racional para los nuevos compuestos antineoplásicos incluiría fuentes como las plantas medicinales con efectos antiproliferativos conocidos o asumidos en las intervenciones biomédicas tradicionales (Shin y cols. 2013). Cuba tiene una inmensa flora y una gran tradición popular en el uso de la medicina verde para la prevención y cura de varias enfermedades (Fuentes 2008). No obstante, su flora medicinal ha sido poco investigada como fuente de compuestos capaces de inhibir la proliferación de las células cancerígenas y propiciar candidatos para su futura inclusión en la clínica. En tal sentido, la búsqueda de tales entidades en la flora medicinal puede constituir un aporte concreto a la solución de ésta problemática.

Los aspectos comentados con anterioridad, sugieren la necesidad de ampliar y profundizar la investigación científica sobre el empleo de especies de la flora medicinal cubana capaces de interferir en los procesos de división celular, mediante el análisis del efecto sobre el ADN o al aparato mitótico. Algunas de las especies autóctonas de Cuba poseen, en la literatura internacional, antecedentes de sus propiedades como inhibidores de la proliferación celular, entre ellas: *Lawsonia inermis*, *Punica granatum*, *Tamarindus indica*, *Ruta graveolens* e *Indigofera suffruticosa*. En tal sentido, los resultados contenidos en este estudio muestran que especies pertenecientes a la flora medicinal cubana poseen potencialidades como antitumorales, de las cuales, *Xanthium strumarium* Linn (Asteraceae), ocupó uno de los lugares primarios por su elevada eficacia.

La **novedad científica** del presente trabajo consiste en: que por primera vez, en Cuba, se demuestran las potencialidades de varias especies como fuente de agentes antiproliferativos en base a los efectos producidos sobre el huso mitótico y sobre el ADN, en particular, se aportan evidencias preclínicas acerca de la actividad antitumoral de la especie *Xanthium strumarium* L., cultivada en Cuba. En el ámbito de la Ciencia, se demuestra por primera vez que el blanco de acción principal de esta especie es el huso mitótico y su mecanismo de acción está dado al interferir en la dinámica de los microtúbulos, la progresión del ciclo durante la mitosis y finalmente la viabilidad celular. Se demuestra que esta actividad es atribuible a las xantatinas sintetizadas por esta especie vegetal. Adicionalmente, se evidencia que, a diferencia de los agentes antimitóticos clásicos, *X. strumarium* L., pudiera estar actuando sobre otros blancos celulares.

Los resultados presentados revisten **importancia teórica** porque: (i) Sobre la base del conocimiento de las potencialidades antimicrotubulares de 78 especies vegetales usadas tradicionalmente por la población cubana, se logra la clasificación de las mismas, como fuentes de agentes antitumorales, en las categorías de: altamente promisorias, moderadamente promisorias y no promisorias. (ii) Amplían la

comprensión acerca de las propiedades antitumorales de la especie vegetal *Xanthium strumarium*, al identificar el principal blanco celular de su modo de acción antimitótico, lo que soporta científicamente sus propiedades farmacológicas, además constituyen fundamentación científica para futuros estudios de modelación *in silico* dirigidos en concretar las interacciones moleculares del mecanismo desestabilizador de microtúbulos. Las evidencias de que *X. strumarium* L., pudiera estar actuando sobre otros blancos celulares (quinesinas y quinasa mitóticas) aportarían argumentos importantes como estrategia terapéutica para los pacientes de cáncer. Así mismo, las xantatinas propuestas como candidatas a compuestos líderes permitirían la obtención de nuevos quimioterapéuticos efectivos.

La **importancia práctica** del presente trabajo consiste en que aporta evidencias sobre la flora medicinal cubana como fuente promisoría de nuevas moléculas con actividad antiproliferativa. Complementa los estudios de Farmacología y Toxicología especializada que son requisitos indispensables para su registro como fitofármacos. Así mismo, aporta elementos necesarios para la instrucción a la población acerca del uso no controlado de varias especies en la medicina popular y la elaboración de futuras formulaciones farmacéuticas. Además enuncia los argumentos preclínicos esenciales para la evaluación de la especie *Xanthium strumarium* L. en el escenario clínico, y avala a las xantatinas como candidatas a compuestos líderes para la futura obtención de nuevos quimioterapéuticos.

RESULTADOS

2.1 Evaluación del potencial genotóxico de especies de la flora cubana

Fueron seleccionadas para esta investigación 78 especies, las mismas se encuentran listadas en la tabla 1. El criterio de selección fue que tuvieran declarado por las encuestas etnobotánicas o comprobado por la Farmacología Experimental actividad antiparasitaria, antifúngica, abortiva, antitumoral o toxicidad sistémica. Para la evaluación del efecto sobre el ADN se utilizó el ensayo *in vitro* *Salmonella*/microsoma (Test de Ames) y el ensayo *in vivo* de inducción de Micronúcleos (Mn) en la medula ósea de ratón. En el ensayo *Salmonella*/microsoma se evaluaron 31 extractos, de los mismos, 25 extractos (80.9%) no mostraron aumentos significativos del número de revertantes con respecto al control, mientras que 6 (19.3%) extractos mostraron daño mutagénico. En el ensayo de inducción de MN, de los 31 extractos evaluados se observó una respuesta negativa en 27 de ellos (87.1%), mientras que 4 (12.9%) mostraron efecto genotóxico en este sistema de ensayo. Los resultados de esta investigación se encuentran detallados en los siguientes artículos: Vizoso Parra y cols.

1997, Ramos y cols. 1998, García López y cols. 2000, Vizoso Parra y cols. 2000, Vizoso Parra y cols. 2000, Vizoso Parra y cols. 2000, García López y cols. 2001, Ramos y cols. 2001, Ramos y cols. 2001, Ramos y cols.

2002, Piloto Ferrer y cols. 2006, Remigio Montero y cols. 2007, Piloto- Ferrer J. y cols. 2008, Remigio y cols.

2008, Remigio Montero y cols. 2008, Sanchez-Lamar y cols. 2008, Piloto-Ferrer y cols. 2009, Lagarto y cols.

2014, Perera y cols. 2016.

2.1 Evaluación de actividad antimicrotubular en especies de la flora medicinal cubana

De 78 especies vegetales se evaluaron 84 extractos, de los cuales, 37 (44%) extractos mostraron actividad antimicrotubular, 25 con una actividad antimicrotubular promisorio y 12 moderada. La concentración mínima efectiva (CME) de los extractos promisorios, se encontraron en un intervalo de 0.08 a 0.6 mg/mL. Entre estos *Xanthium strumarium* L. ocupó el tercer lugar antecedido sólo por los extractos de *Tamarindus indica* L. y *Lawsonia inermis* L. El resultado de actividad antimicrotubular de *X. strumarium* puede estar dado por el anillo α - metilen- γ -lactona de las lactonas sesquiterpénicas que pudiera estar alquilando los grupos mercapto de los residuos de cisteínas de la tubulina interfiriendo con ello el ensamblaje de los microtúbulos (Piloto-Ferrer y cols. 2011). Los informes científicos precedentes sobre su potencial antiproliferativo, conjuntamente con los resultados obtenidos en este screening, hacen de esta especie una candidata certera para la obtención de nuevos compuestos anti-cáncer, razón que dio origen a la selección de ella como objeto de la presente investigación.

2.2. Caracterización del perfil de respuesta antitumoral de *X. strumarium* cultivado en Cuba.

Para evaluar la respuesta antitumoral de *X. strumarium* primeramente se realizó la caracterización físico-química del extracto total según lo descrito en las Normas Ramales de Salud Pública (NRSP-312, 1992). A partir de éste se realizaron extracciones con cloroformo para obtener la fracción clorofórmica debido a que es la que contiene las lactonas sesquiterpénicas (componentes activos de la planta). Los parámetros de calidad (características organolépticas, sólidos totales, índice de refracción, densidad, contenido de alcohol, pH y conteo microbiológico) se determinaron de acuerdo a las normas establecidas para extractos vegetales (NRSP-312 1992). La identificación de los compuestos contenidos en la fracción clorofórmica se realizó por análisis de rastro de cromatografía gaseosa y un espectrómetro de masas (CG-EM) (Piloto-Ferrer J. y cols. 2016). Para analizar la respuesta antitumoral en células cancerosas, se emplearon cuatro líneas de origen humano y cuatro de origen murino, las cuales fueron tratadas con el extracto total y con la fracción clorofórmica de *X. strumarium*, según el protocolo indicado por el INC de los EUA (Boyd 1997). La viabilidad celular se analizó con el ensayo MTT (Mosmann 1983) y los resultados mostraron que ambos extractos inhibieron la viabilidad en todas las líneas de células tumorales. Los valores de CI50 obtenidos con el extracto total variaron entre 26.8 y 86.1 $\mu\text{g/mL}$, los obtenidos con la fracción clorofórmica fueron inferiores a los del extracto total en todas las líneas ensayadas. Las células de cáncer de colon (CT26WT) resultaron las más sensibles (CI50 = 26.8 $\mu\text{g/mL}$) seguida por

células de melanoma (B16F10), de linfoma (U937) y de carcinoma mamario (F3II). Las líneas de: adenocarcinomas mamarios (MCF7 y MDA-MB231), carcinoma pulmonar (A549) y melanoma (B16F1), fueron menos sensibles para ambos extractos. Este resultado motivó la selección de la línea CT26WT para practicar los experimentos in vitro subsiguientes: ensayo clonogénico (Franken y cols. 2006), para evaluar el efecto antiproliferativo; citometría de flujo, para evaluar las fases del ciclo celular y el marcaje inmunofluorescente de Annexina, para la muerte celular. Tanto el extracto total como el clorofórmico produjeron reducciones significativas en la capacidad de formar colonias, arresto del ciclo celular en la subpoblación G2/M y aumento significativo de muerte celular apoptótica.

La actividad antitumoral, en experimentos in vivo, se evaluó mediante dos diseños singénicos de cáncer, utilizando la línea celular CT26WT, en ratones Balb/c: el modelo de tumor primario (Menna y cols., 2003) y el modelo de metástasis experimental (Kim y cols., 2003). En ambos diseños se midió la proporción de células apoptóticas. Una vez implantado el tumor, los grupos tratados mostraron una inhibición significativa de la progresión tumoral. La fracción clorofórmica, a las dosis de 10, 50 y 100 mg/Kg, redujo el volumen tumoral en 42.9, 49.6 y 92.9 % respectivamente. El índice mitótico disminuyó significativamente a la dosis 100 mg/Kg, tanto de la fracción clorofórmica como del extracto total. Conjuntamente se observó un aumento de células apoptóticas. La metástasis inducida, fue reducida por los dos extractos; sin embargo, esta acción fue más efectiva en ratones tratados con el extracto total. El peso de los pulmones con metástasis corroboró los resultados obtenidos. Histopatológicamente se evidenció un incremento del número de células apoptóticas en correspondencia con la dosis aplicada. Resultó particularmente interesante el hecho de que estos resultados se hayan obtenido en células de cáncer colorectal ya que en las mismas se produce resistencia al taxol, y otras drogas relacionadas, con regularidad.

2.3. Bases del modo de acción de *X. strumarium* en cuanto al efecto sobre el ADN o sobre el aparato mitótico

La profundización en el análisis de la acción primaria de *X. strumarium* en el interior celular, se realizó con experimentos en dos direcciones: evaluar si la causa primaria del efecto antiproliferativo radica en el daño directo al ADN o en el daño al huso mitótico. Los experimentos para evaluar diferentes niveles de expresión de daño al ADN fueron: el ensayo Cometa (Cornetta y cols. 2008, ICH 2011) en células CHO, en la evaluación de daño a la estructura primaria del ADN; el ensayo de mutación reversa en *Salmonella typhimurium* His- (Test de Ames) (Maron y Ames 1983) para evaluar mutaciones génicas y el ensayo de aberraciones cromosómicas (ICH 2011) para detectar daño cromosómico. Sólo se observaron respuestas de daño positivas a la concentración más alta evaluada (45 µg/mL) en los ensayos cometa y aberraciones cromosómicas. Dicha concentración, resultó altamente tóxica para las células de ambos ensayos, en tales condiciones experimentales, no se puede afirmar que el daño al DNA sea causa primaria del efecto antiproliferativo; menos aun cuando el ensayo de mutagenicidad produjo resultados negativos. Por tanto, resulta más atinado

plantear que *X. strumarium* no afecta al ADN como blanco primario de su acción ya que media la citotoxicidad sistémica en el efecto genotóxico observado (Piloto-Ferrer J. y cols. 2014). Con relación a la consideración del huso mitótico como blanco primario, se evaluó el efecto del extracto total sobre la viabilidad de células CHO expuestas a dos variantes de tratamiento: agudo (3h) y continuo (72h). Además, se estudiaron en este modelo parámetros de la proliferación celular como: fases del ciclo celular, índice mitótico, fases de la mitosis y muerte celular. Un interés particular, en esta etapa de la investigación, fue corroborar si persistía, en el contexto del interior celular, la capacidad del extracto de interferir el ensamblaje de los microtúbulos; para ello, se empleó la tinción inmunofluorescente con anticuerpos: anti α -tubulina de ratón, anti- γ -tubulina de conejo y Alexa-488 o Rodamina-RedX como anticuerpos secundarios conjugados. El conjunto de los resultados obtenidos en estos experimentos conllevaron a la conclusión más importante de esta investigación: la demostración de que el efecto antiproliferativo de *X. strumarium* radica básicamente en interferir la dinámica de estructuración del huso mitótico, con lo cual impide la transición metafase–anafase y conlleva a la muerte celular apoptótica (Sanchez-Lamar y cols. 2016).

Identificación de metabolitos responsables de la actividad antimitótica

La extracción clorofórmica de *X. strumarium* fue separada en fracciones químicas menos complejas por cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa. Se centró la atención en un grupo de sustancias hidrofóbicas, de tiempo de retención (tr) de 17 a 21 minutos, característicos de los sesquiterpenos bioactivos, a fin de identificar si los xantonólidos estaban involucrados en la bioactividad evaluada. El registro de la proporción de células en ana-telofase fue empleado como criterio de la bioactividad guiadora del fraccionamiento. Luego de

tres procesos sucesivos de fraccionamiento biodirigido, se obtuvo como resultado una subfracción (denominada F1C) que fue la más activa. La tinción inmunofluorescente de células de carcinoma colorectal humano-HCT116 tratadas con esta subfracción, aportó evidencias irrefutables sobre la afectación del huso mitótico, donde se observaron husos monopolares, microtúbulos con estructuras desordenadas y cromosomas no alineados, avalando a los metabolitos contenidos en dicha fracción como responsables de la actividad antimitótica (Sánchez-Lamar y col. 2016). La identificación, en ella, de los xantonólidos fue mediante CG-EM, de donde resultó ser la xantatina y una forma isomérica de esta (la 8-epi-xantatina) los fitocomponentes evidenciados como los principales reponsables de la actividad antiproliferativa. La cuantificación de ellos se realizó por espectrofotometría UV-VIS (Ramirez-Erosa y cols. 2007, Romero y cols. 2015). La cantidad de xantatinas en el extracto total fue de 0.16 mg/mL correspondiente a una concentración de 36 mg de xantatinas por g del extracto total (3.6%). Las dosis efectivas medias para el extracto total y la subfracción F1C fueron 3.6 y 4 μ M, respectivamente. En consecuencia, las xantatinas de *X. strumarium* constituyen moléculas candidatas a prototipos para la obtención de nuevos compuestos eficaces farmacológicamente (Piloto-Ferrer J 2015).

De conjunto, los resultados experimentales contenidos en la presente investigación

develan por primera vez las potencialidades de varias especies de uso medicinal como fuente de agentes antiproliferativos y la identidad del principal blanco celular de la acción de *X. strumarium* L., aportando un conjunto de conocimientos sobre las bases moleculares y celulares que contribuyen a explicar el amplio efecto antineoplásico en modelos preclínicos de cáncer.

CONCLUSIONES

1. En la flora medicinal cubana, usada tradicionalmente por la población, los extractos obtenidos de las especies vegetales: *Tamarindus indica* L., *Lawsonia inermis* L., *Xanthium strumarium* L., *Ruta graveolens* L., *Punica granatum* L., e *Indigofera suffruticosa* Mill poseen potencialidades como antitumorales. Estos resultados enuncian argumentos esenciales para la caracterización antitumoral de estas especies y constituyen fundamentación científica para futuros estudios.
2. La especie *Xanthium strumarium* L., cultivada en Cuba, exhibió un efecto citotóxico en líneas tumorales de origen humanas y murinas. En ello, se destacó la acción antiproliferativa ejercida sobre las células de carcinoma colorrectal (CT26WT) donde adicionalmente produjo un efecto antitumoral y antimetastásico *in vivo*.
3. En el ámbito celular, la base principal del efecto antiproliferativo ejercido por *X. strumarium*, no fue mediante la afectación a la molécula de ADN sino que, radicó en una actividad de carácter antimitótico. Su modo de acción es ejercido sobre el huso mitótico que constituyó su principal blanco de acción al interferir sobre su dinámica que afectó la transición de metafase-anafase y condujo a una subsecuente apoptosis.
4. El fraccionamiento bioguiado exhibió que las xantatinas (lactonas sesquiterpénicas) están presentes en la fracción F1C obtenida de la fracción clorofórmica de la especie cubana y son responsables del efecto antimitótico, mecanismo sustentado por la formación de husos monopolares, detención de la mitosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuario-Estadístico (2016). Anuario estadístico de salud 2015. MINSAP, Dirección de registros médicos y estadísticas de salud, La Habana.

Boyd, M. R. (1997). The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. *Anticancer Drug Development Guide*, Springer: 23-42.

Cornetta, T., L. Padua, A. Testa, E. Ievoli, F. Festa y cols. (2008). Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 638(1): 75-82.

Cragg, G. M. y J. M. Pezzuto (2015). Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Med Princ Pract*: 1-19.

Domenech, E. y M. Malumbres (2013). Mitosis-targeting therapies: a troubleshooting guide. *Curr Opin Pharmacol* 13(4): 519-528.

Dumontet, C. y M. A. Jordan (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 9(10): 790-803.

Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman y C. van Bree (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5): 2315-2319.

Fuentes, F. V. R. (2008). Las especies medicinales amenazadas en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*: 77-81.

García López, A., A. Vizoso Parra, A. Ramos Ruiz, J. Piloto Ferrer, V. Pavón González y cols. (2001). Estudio toxicogenético de un polisacárido del gel de Aloe vera L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 6(2): 52-55.

García López, A., Á. Vizoso Parra, A. Ramos Ruiz y J. Piloto (2000). Estudio toxicogenético de un extracto fluido de ocimum basilicum L. (albahaca blanca). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5(3): 78-83.

Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* 9(12): 767-776.

ICH (2011). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals

for Human Use. ICH Expert Working Group.

Jordan, M. A. y L. Wilson (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4(4): 253-265.

Kumar, V., A. K. Abbas, N. Fausto y J. C. Aster (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Elsevier Health Sciences.

Lagarto, A., E. Sánchez, J. Piloto, A. Remigio, P. Barzaga y cols. (2014). Obtaining and characterizing the *Momordica charantia* Linn leaf extracts. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16(4): 782-788.

Lee, S. y C. A. Schmitt (2003). Chemotherapy response and resistance. *Current opinion in genetics & development* 13(1): 90-96

Maron, D. M. y B. N. Ames (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113(3-4): 173-215.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1): 55-63.

Mukhtar, E., V. M. Adhami y H. Mukhtar (2014). Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 13(2): 275-284.

NRSP-312 (1992). Norma Ramal de Salud Pública. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas, Ed. MINSAP. Ciudad de La Habana: .

Perera, L. M. S., J. Piloto, D. Canelosota, L. Pelzer y B. Mancebo (2016). Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract. HPLC Method Proposed for Determinating.

Piloto- Ferrer J., Remigio A., Vega Y., Rodríguez C. y Carballo C. (2008). *Tamarindus indica* L. ("tamarindo"): Evaluación del Potencial Mutagénico y Antioxidante. *Lat. Am. J. Pharm* 27(3): 375-379.

Piloto-Ferrer, J., T. Stoiber, A. Vizoso, Y. Vega, C. Rodríguez y cols. (2011). Search

of new antimitotics compounds from the Cuban flora. Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát 10(1): 75-82.

Piloto-Ferrer, J., A. Vizoso Parra, A. Ramos Ruiz, A. García López, A. Remigio Montero y cols. (2009). Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8(5).

Piloto-Ferrer J, Z. I., Cuello S, Francisco M, Romero A, González ML, Pasquale S, Fiore M, Sánchez-Lamar A, Isla M (2015). Bioactivity-guided fractionation for anti-cancer activity of *Xanthium strumarium* L. and their responsible constituents. J Pharm Pharmacogn Res 3: OC-68.

Piloto-Ferrer J., Cozzi R., Cornetta T., Stano P, Fiore M. y cols. (2014). *Xanthium strumarium* L. extracts produce DNA damage mediated by cytotoxicity in in vitro assays but does not induce micronucleus in mice. Biomed Res Int 2014: 575197.

Piloto-Ferrer J., Zampini C., Cuello S., Francisco M., Romero A. y cols. (2016). Cytotoxic Compounds from Aerial Organs of *Xanthium strumarium*. Natural Product Communications 11(3): 371-376.

Piloto Ferrer, J., A. Ramos Ruiz, A. Vizoso Parra, A. García López, M. Guerra y cols. (2006). Evaluación del potencial genotóxico de *Boerhavia erecta* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales 11(1): 0-0.

Ramirez-Erosa, I., Y. Huang, R. A. Hickie, R. G. Sutherland y B. Barl (2007). Xanthatin and xanthinosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. Can J Physiol Pharmacol 85(11): 1160-1172.

Ramos, A., A. Edreira, A. Vizoso, J. Betancourt, M. Lopez y cols. (1998). Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. J Ethnopharmacol 61(1): 49-55.

Ramos, A., J. Piloto, A. Visozo, A. Garcia, H. Lastra y cols. (2001). Mutagenicity and antioxidant assessment of *Stachitapheta jamaicensis* (L.) Vahl. Phytother Res 15(4): 360-363.

- Ramos, A., R. Rivero, M. C. Victoria, A. Visozo, J. Piloto y cols. (2001). Assessment of mutagenicity in *Parthenium hysterophorus* L. *J Ethnopharmacol* 77(1): 25-30.
- Ramos, A., R. Rivero, A. Visozo, J. Piloto y A. Garcia (2002). Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. *Mutat Res* 514(1-2): 19-27.
- Remigio, A., Piloto-Ferrer J., Vega Y., Rodriguez C., Carballo C. y cols. (2008). Positive genotoxic activity of plants used in Cuba. *Toxicology Letters* 180: S241.
- Remigio Montero, A. C., J. Piloto Ferrer, A. García López, M. Guerra Ordoñez, E. Sánchez Gobin y cols. (2007). Genotoxicidad de *Indigofera suffruticosa* Mill:(añil cimarrón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 12(3): 0-0.
- Remigio Montero, A. C., Y. Vega Hurtado, J. Piloto Ferrer y J. Rodríguez Chanfrau (2008). Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq.(tilo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 13(2): 0-0.
- Romero, M., M. Zanuy, E. Rosell, M. Cascante, J. Piulats y cols. (2015). Optimization of xanthatin extraction from *Xanthium spinosum* L. and its cytotoxic, anti-angiogenesis and antiviral properties. *Eur J Med Chem* 90: 491-496.
- Sanchez-Lamar, A., G. Fonseca, J. L. Fuentes, R. Cozzi, E. Cundari y cols. (2008). Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol* 115(3): 416-422.
- Sanchez-Lamar, A., J. Piloto-Ferrer, M. Fiore, P. Stano, R. Cozzi y cols. (2016). *Xanthium strumarium* extract inhibits mammalian cell proliferation through mitotic spindle disruption mediated by xanthatin. *J Ethnopharmacol* 194: 781-788.
- Schmidt, M. y H. Bastians (2007). Mitotic drug targets and the development of novel anti- mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updat* 10(4): 162-181

Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba Vol. 8 No.1

Shin, S. Y., J.-H. Kim, H. Yoon, Y.-K. Choi, D. Koh y cols. (2013). Novel antimitotic activity of 2-hydroxy-4-methoxy-2', 3'-benzochalcone (HymnPro) through the inhibition of tubulin polymerization. *J Agric Food Chem* 61(51): 12588-12597.

Umar, A., B. K. Dunn y P. Greenwald (2012). Future directions in cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 12(12): 835-848.

Vizoso Parra, Á., A. García López, A. Ramos Ruiz, J. Piloto Ferrer y R. Rivero Martínez (2000). Derivados antraquinónicos del Aloe vera L: Tamizaje genotóxico. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5(2): 46-50.

Vizoso Parra, Á., G. López, R. Ruiz, J. Piloto Ferrer, V. Pavón González y cols. (2000).

Evaluación mutagénica de un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70% de teloxys ambrosioides. weber (apasote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5(3): 102-107.

Vizoso Parra, A., A. Ramos Ruiz, M. Decalo Michelena y J. Betancourt Badell (1997).

Estudio genotóxico in vitro e in vivo en tinturas de *Melissa officinalis* L.(toronjil) y *Mentha piperita* L.(toronjil de menta). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2(1): 6-11.

Vizoso Parra, Á., A. Ramos Ruiz, A. García López, J. Piloto Ferrer y V. Pavón González (2000). Estudio genotóxico in vitro e in vivo del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de *Aloe vera* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5(3): 91-96.

Tabla 1. Resultado del estudio de las potencialidades antitumorales de especies de la flora medicinal cubana.

	Nombre científico	Parte utilizada	Ensayo ^(a) c = 1 mg/mL	Test de Ames	Inducción MN
1.	<i>Spondias purpurea</i> L.	Follaje	++		
2.	<i>Annona muricata</i> L.	hojas	++		
3.	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Follaje	++		
4.	<i>Panicetum mutata</i> L.	Follaje	++		
5.	<i>Xanthium strumarium</i> L.	Follaje	++	-	-
6.	<i>Xanthium strumarium</i> L.	Raíz	++		
7.	<i>Tamarindus indica</i> L.	Corteza	++	-	+
8.	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg	Follaje	++		
9.	<i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poir	Tallo	++	-	-
10.	<i>Ricinus communis</i> L.	Follaje	++		
11.	<i>Terminalia catappa</i> L.	Hojas	++		
12.	<i>Momordica charantia</i> L.	Partes aéreas	++	-	-
13.	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng.	Hojas	++	-	-
14.	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng. (extracto)	Hojas	++		
15.	<i>Lawsonia inermis</i> L.	Follaje	++	-	-
16.	<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Partes aéreas	++	-	-
17.	<i>Psidium guajava</i> L.	Hojas	++		
18.	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Staf.	Follaje	++	-	-
19.	<i>Zea mays</i> L.	Estromas	++		
20.	<i>Rhizophora mangle</i> L.	Hojas	++	-	-
21.	<i>Rhizophora mangle</i> L.	Corteza	++		
22.	<i>Coffea arabica</i> L.	Frutos	++		
23.	<i>Ixora coccinea</i> L.	Follaje	++		
24.	<i>Citrus radiculata</i> L.	Follaje	++		
25.	<i>Lantana camara</i> L. var. Camara	Follaje	++		
26.	<i>Bidens pilosa</i> L.	Partes aéreas	+		
27.	<i>Tagetes erecta</i> L.	Follaje	+		
28.	<i>Bixa orellana</i> L.	Frutos	+		
29.	<i>Tamarindus indica</i> L.	Follaje	+		
30.	<i>Mentha x piperita</i> L.	Partes aéreas	+	-	-
31.	<i>Salvia officinalis</i> L.	Follaje	+	-	-
32.	<i>Piper auritum</i> H.B.K.	Follaje	+	-	-
33.	<i>Plantago lanceolata</i>	Follaje	+	-	-
34.	<i>Cymbopogon winterianus</i> L. ACUOSO	Follaje	+		
35.	<i>Ruta graveolens</i> L.	Partes aéreas	+	+	+
36.	<i>Brugmansia candida</i> Pers.	Hojas, flores	+		
37.	<i>Cissus sicyoides</i> L.	Follaje	+		
38.	<i>Justicia pectoralis</i> Jacq. var Pectoralis	Partes aéreas	-	-	-
39.	<i>Pancreatum areniculum</i> (Nothrop) Alain.	Rizoma	-		
40.	<i>Annona reticulata</i> L.	Hojas	-		
41.	<i>Anethum graveolens</i> L.	semillas	-		
42.	<i>Nerium oleander</i> L.	Partes aéreas	-		

43.	<i>Artemisa</i>	Partes	-	-	-
44.	<i>Calendula officinalis</i> L.	Flores	-	-	-
45.	<i>Matricaria recutita</i> L.	Flores	-	-	-
46.	<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
47.	<i>Indigofera suffruticosa</i> .	Follaie	-	+	+
48.	<i>Lepidium virginicum</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
49.	<i>Bromelina pinguin</i> L.	Hojas, Frutos	-	-	-
50.	<i>Nopalea coccinellofera</i> (L.)				
51.	<i>Cassia grandis</i> L.	Semilla	-	-	-
52.	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Planta	-	-	-
53.	<i>Cecropia peltata</i> L.	Follaje	-	-	-
54.	<i>Carica papaya</i> L.	Hojas	-	-	-
55.	<i>Teloxys ambrosioides</i> (L.)			Planta	+
56.	<i>Rhoeo spathacea</i> (Sw) Steam	Follaje	-	-	-
57.	<i>Ricinus communis</i> L.	Raíz	-	-	-
58.	<i>Abrus precatorius</i> L.	Follaie	-	-	-
59.	<i>Caianus caian</i> (L) Huth	Follaie	-	-	-
60.	<i>Erythrina</i> sp.	Follaie	-	-	-
61.	<i>Melissa officinalis</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
62.	<i>Mentha spicata</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
63.	<i>Aloe vera</i> L.	Hojas	-	+	-
64.	<i>Aloe vera</i> L.	Corteza de	-	-	-
65.	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
66.	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
67.	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
68.	<i>Orthosiphon aristatus</i> (Blume)				
69.	<i>Boerhavia erecta</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
70.	<i>Thuja occidentalis</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
71.	<i>Piper aduncum</i> L.	Planta	-	-	-
72.	<i>Plantago major</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
73.	<i>Petiveria alliacea</i> L.	Planta	-	-	-
74.	<i>Melia azederach</i> L.	Partes aéreas	-	-	-
75.	<i>Musa paradisiaca</i> L.	Jugo	-	-	-
76.	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Planta	-	-	-
77.	<i>Punica granatum</i> L.	Frutos	-	+	+
78.	<i>Ruta chapelensis</i> L.	Follaje	-	-	-
79.	<i>Pouteria mammosa</i> (L.)				
80.	<i>Curcuma longa</i> L.	Rizoma	-	-	-
81.	<i>Lipia alba</i> (Millsp) N.E. Br	Partes aéreas	-	-	-
82.	<i>Stachitapheta</i>		-	-	-
83.	<i>Capsicum frutescens</i> L. var				
84.	<i>Solanum americanum</i> L.	Follaje	-	-	-