

EVALUACIÓN DE FLAVONOIDES SOBRE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS

Francisco Estévez^{1,2}, José Quintana^{1,2}, Maria Teresa Marrero¹, Gledy Negrín^{1,2}, Olga Burmistrova¹, Sara Estévez¹, Sara Rubio², Fernando Torres¹, Fabio Nicolini¹, Jorge Triana^{2,3}, José L. Eiroa^{2,3}, Mariana López^{2,3}, Francisco J. Pérez^{2,3}, Jesús G. Díaz⁴, Francisco León⁵, Ignacio Brouard⁵, Jaime Bermejo⁵

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad Asociada al C.S.I.C., Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Plaza Dr Pasteur s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria

²Instituto Canario de Investigación del Cáncer

³Departamento de Química, Unidad Asociada al C.S.I.C., Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria

⁴Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, 38206 La Laguna, Tenerife

⁵Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del C.S.I.C.-Instituto de Bio-Orgánica "Antonio González"

ÍNDICE:

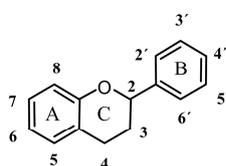
- 1. RESUMEN**
 - 2. AGRADECIMIENTOS**
 - 3. REFERENCIAS**
-

1. RESUMEN

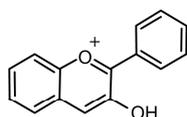
Los flavonoides son compuestos polifenólicos que desempeñan un amplio espectro de actividades biológicas y se consideran potenciales agentes antitumorales. En la última década hemos evaluado sus efectos sobre la viabilidad y la proliferación celular en diferentes líneas tumorales humanas y encontramos que algunos son altamente citotóxicos. De la amplia colección de compuestos ensayados hemos seleccionado los más potentes y explorado las vías de señalización implicadas en la muerte celular, centrándonos en las vías de las caspasas, las proteínas quinasas activadas por mitógenos y la generación de especies reactivas de oxígeno.

Han transcurrido diez años después de la revisión exhaustiva por Middleton y colaboradores en *Pharmacological Reviews* sobre los flavonoides y su impacto en la enfermedad coronaria, la inflamación y el cáncer [1]. Esta revisión fue seguida por la de Havsteen sobre la bioquímica y la importancia médica de los flavonoides en *Pharmacology & Therapeutics* [2] y la de Ren y colaboradores en *Medicinal Research Reviews* [3] que han enfatizado la importancia de estas moléculas como potenciales agentes en la lucha contra el cáncer.

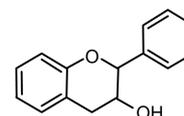
En esta última década nuestro grupo también ha contribuido con importantes aportaciones en este interesante campo, fruto del esfuerzo tanto en el aislamiento y elucidación estructural como en la evaluación biológica de estos compuestos.



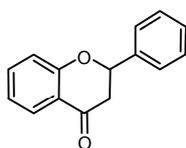
Flavonoide (1)



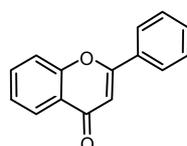
Antocianidina (2)



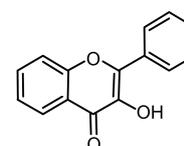
Flavan-3-ol (3)



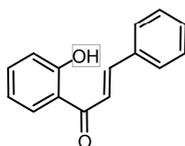
Flavanona (4)



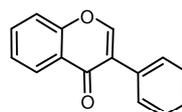
Flavona (5)



Flavonol (6)



Chalcona (7)



Isoflavona (8)

Clasificación de los flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos con una estructura común fenilbenzo- γ -pirona (C6-C3-C6) (**1**), que se encuentran en alimentos de origen vegetal y se clasifican según el nivel de saturación y la apertura del anillo de pirano central. Normalmente se subdividen de acuerdo a sus sustituyentes en antocianidinas (**2**), flavanoles (o catequinas) (**3**), flavanonas (**4**), flavonas (**5**), flavonoles (**6**) y chalconas (**7**). Esta estructura básica consiste en dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico central (C) de pirano o de pirona (conteniendo un doble enlace). La subdivisión se basa principalmente en la presencia (o ausencia) de un doble enlace en posición 4 del anillo C, la presencia (o ausencia) de un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 del anillo C, y la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B. En la estructura flavonoide, la posición 2 del anillo de pirona está normalmente sustituida por un grupo fenilo (el anillo B). En los isoflavonoides (**8**), la sustitución tiene lugar en la posición 3 del anillo de pirona [4].

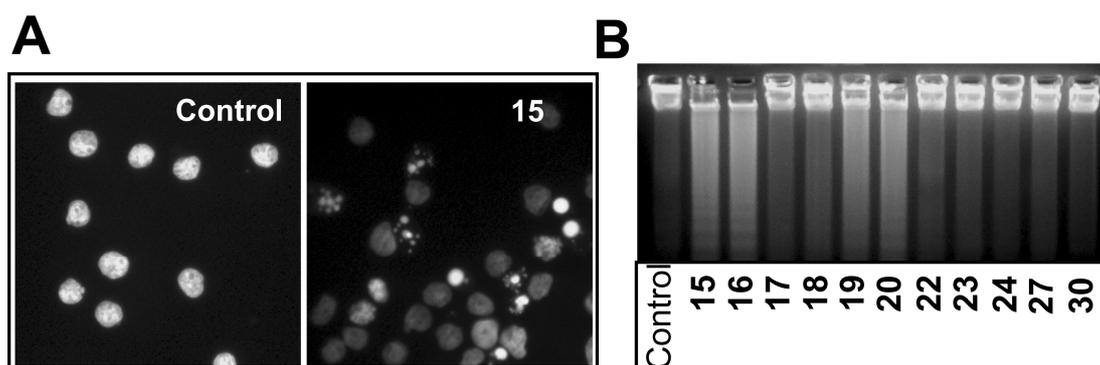
En las plantas los flavonoides se encuentran en estado libre o unidos a azúcares formando heterósidos, que es lo más frecuente debido a que les confiere una mayor estabilidad química. Estos heterósidos son polares y se extraen en agua o en etanol.

Estos compuestos polifenólicos presentan un espectro importante de actividades biológicas, incluyendo aquellas que podrían ser capaces de influir en procesos que desencadenan el desarrollo del cáncer. Por tanto, pueden tener efectos beneficiosos para la salud y considerarse posibles protectores o agentes terapéuticos contra el cáncer. Las propiedades antitumorales de estos compuestos están mediadas por diferentes tipos de parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis, una forma activa de muerte celular que desempeña un papel esencial en el desarrollo y la supervivencia y es una respuesta importante a la mayoría de los agentes quimioterápicos. Las células que experimentan esta forma de muerte celular manifiestan una serie de características como la fragmentación internucleosómica del ADN, la translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular, la formación de cuerpos apoptóticos, la condensación de la cromatina y la activación de las caspasas.

La apoptosis está altamente regulada por un juego de genes que promueven tanto la muerte como la supervivencia celular, y está mediada a través de una red altamente organizada de proteasas y sus inhibidores en respuesta a estímulos nocivos intra- y extracelulares. Los fallos en la regulación de la apoptosis pueden desempeñar un papel crítico en la oncogénesis. Una serie de estudios recientes han demostrado que la mayoría, si no todos, los agentes quimioterápicos ejercen sus efectos antitumorales induciendo este tipo de muerte en células y tejidos diana. En este sentido, se ha demostrado la inducción de apoptosis por derivados de fenilbenzopironas en algunas líneas celulares tumorales a través de diferentes mecanismos moleculares, incluyendo la inhibición de la actividad ADN topoisomerasa I/II, la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS), la regulación de la expresión de proteínas de choque térmico, la modulación de rutas de

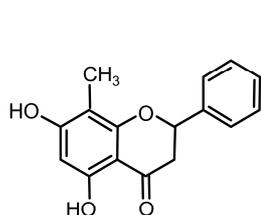
señalización, la liberación de citocromo c y la activación subsiguiente de caspasa-9 y caspasa-3, la disminución en la expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L e inducción de la expresión de Bax y Bak, la activación endonucleasa y la supresión de la proteína Mcl-1.

Nuestra primera aportación fue la evaluación de veintidós compuestos (**9** al **30**) con un núcleo fenilbenzo-γ-pirona, la mayoría de ellos obtenidos de fuentes naturales, en cinco líneas tumorales humanas (HL-60, A431, SK-OV-3, HeLa y HOS). Los resultados se publicaron en la revista *European Journal of Pharmacology* en el año 2006 [5].

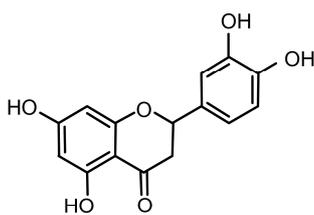


A. *Microfotografías de campos representativos de células HL-60 teñidas con bisbenzimidida para evaluar la condensación de la cromatina de células control o tratadas con 10 μM de compuesto 15.*

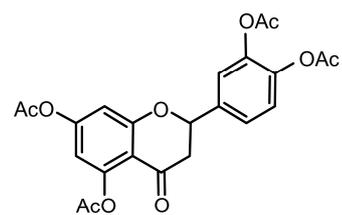
B. *Fragmentación de ADN en células HL-60 tratadas con los diferentes flavonoides especificados.*



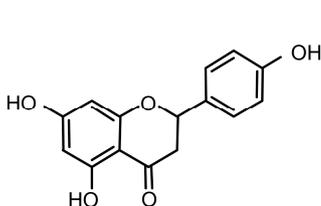
Criptostrobina (9)



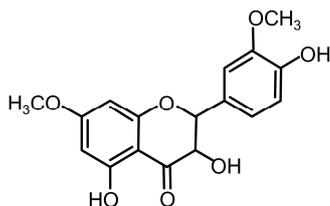
Eriodictyol (10)



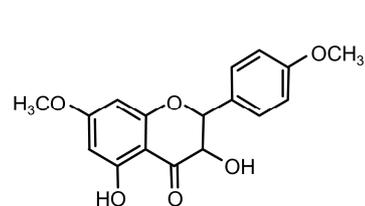
Tetracetato de Eriodictyol (11)



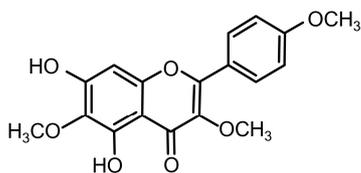
Naringina (12)



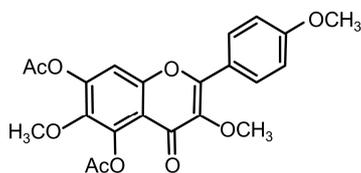
7,3'-dimetiléter de dihidroquercetina (13)



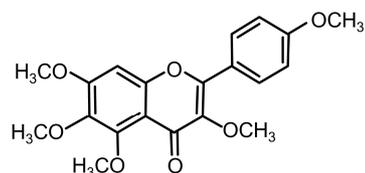
7,4'-dimetiléter de dihidrokaempferol (14)



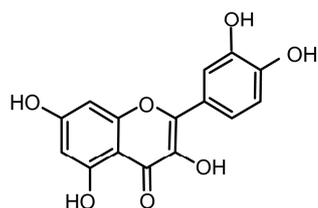
3-metiléter de Betuletol (15)



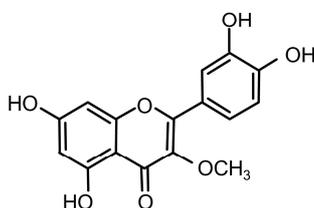
Diacetato de 3-metiléter de betuletol (16)



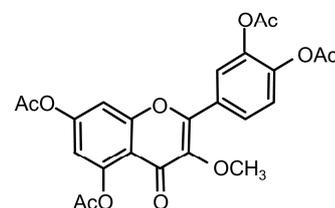
3,5,7-trimetiléter de betuletol (17)



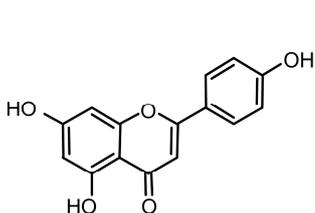
Quercetina (18)



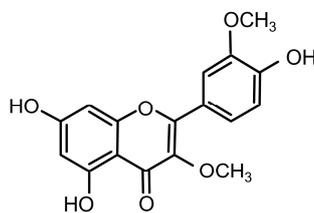
3-Metiléter de Quercetina (19)



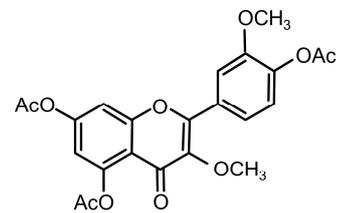
Tetracetato de 3-Metiléter de Quercetina (20)



Apigenina (21)



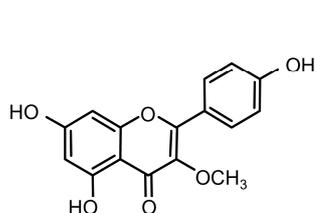
3,3'-Dimetiléter de Quercetina (22)



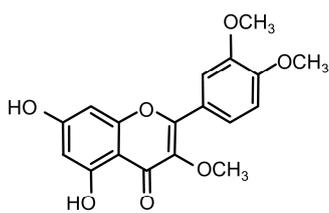
Triacetato de 3,3'-dimetiléter de Quercetina (23)

Entre los compuestos ensayados, el 3-metil éter de betuletol (15) y su diacetato (16) resultaron ser los más citotóxicos.

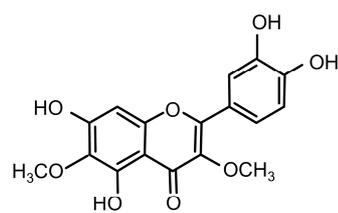
Evaluación de flavonoides sobre la viabilidad y proliferación de las células leucémicas humanas.



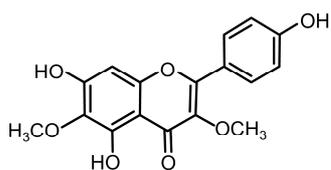
3-metiléter de kaempferol (**24**)



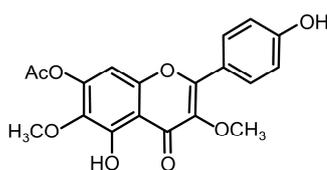
5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona (**25**)



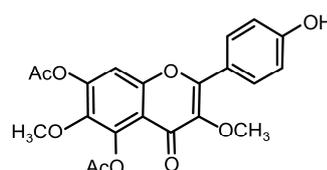
Axilarina (**26**)



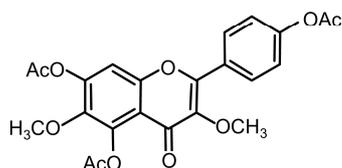
4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**27**)



7-acetoxi-4',5-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**28**)

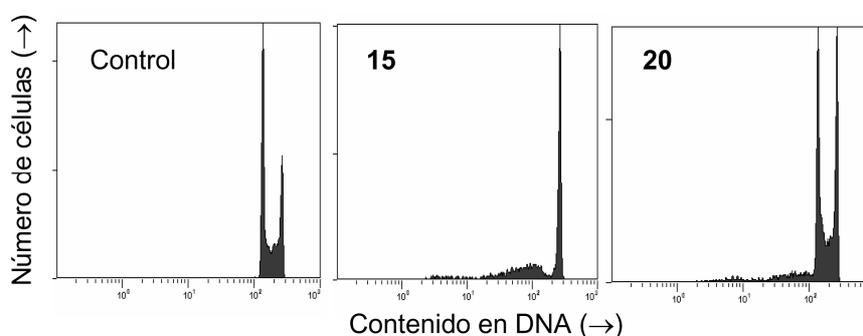


5,7-diacetoxi-4'-hidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**29**)

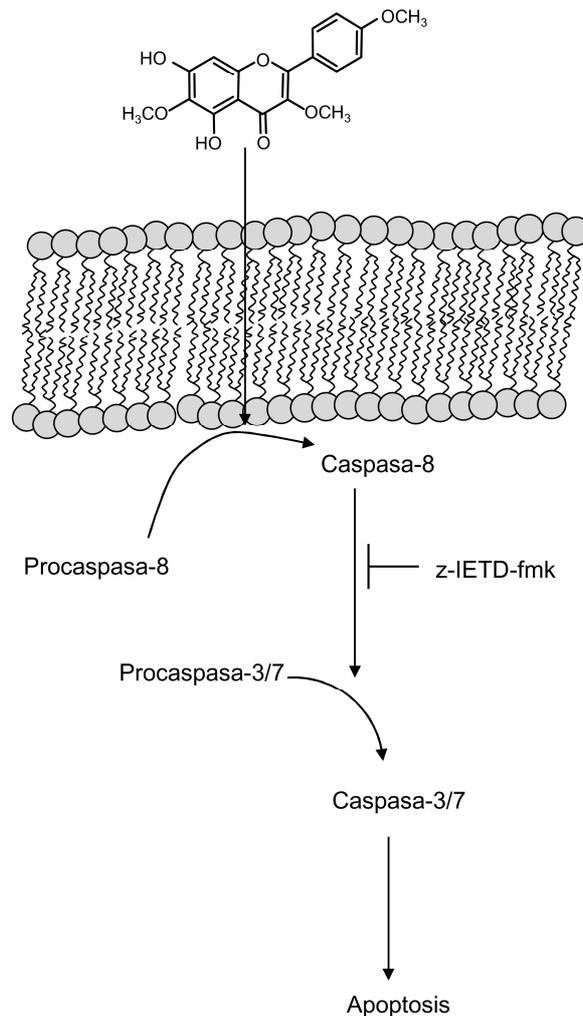


4',5,7-triacetoxi-3,6-dimetoxiflavona (**30**)

La línea celular HL-60 fue especialmente sensible a estos compuestos, con valores de IC_{50} de aproximadamente $1 \mu M$. Los estudios de dosis-respuesta pusieron de manifiesto que tanto los linfocitos quiescentes como los proliferantes son resistentes a los derivados del betuletol. El 3-metil éter de betuletol (**15**) indujo apoptosis en las células HL-60, efecto que fue bloqueado por el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk y también por el inhibidor específico de caspasa-8 z-IETD-fmk indicando activación de la vía extrínseca.



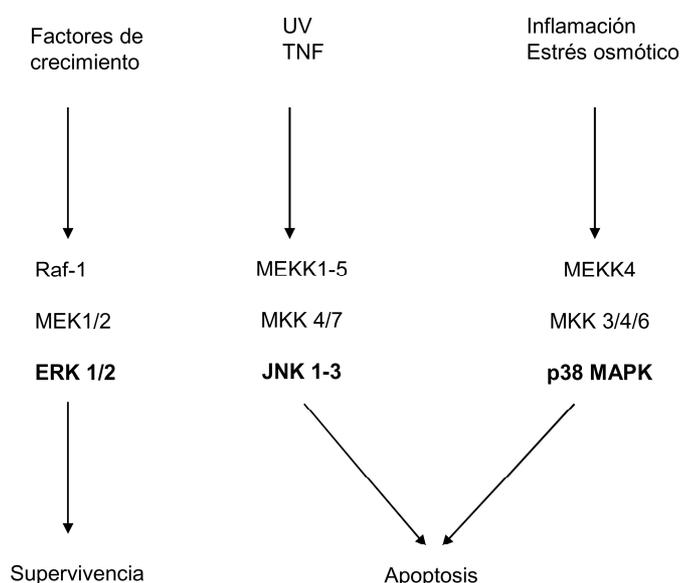
*Efectos de los compuestos **15** y **20** sobre el ciclo celular en células HL-60.*



*La caspasa-8 desempeña un papel crucial en la muerte celular desencadenada por el compuesto **15**.*

Una de las dianas que hemos estudiado la constituye la familia de serina/treonina proteína quinasas dirigidas a prolinas (MAPK, MAP quinasas). En mamíferos comprenden principalmente las cascadas ERK1/2 (proteínas quinasas activadas por señales extracelulares 1/2), SAPK/JNK (proteínas quinasas activadas por estrés / proteínas quinasas N-terminal de *c-jun*) y p38^{MAPK} (p38 MAP quinasas). Un modelo ampliamente aceptado es que el balance entre las ERK activadas por factores de crecimiento y las rutas activadas por estrés JNK y p38^{MAPK} determina si la célula vive o muere. La implicación de estas cascadas de quinasas en señales de muerte y supervivencia las hacen útiles candidatos para la modulación terapéutica. Un buen ejemplo de su potencial como dianas para la regulación de la resistencia a fármacos ha sido demostrado para el paclitaxel. Uno de los objetivos que hemos abordado ha sido determinar si la señalización por MAP quinasas está implicada en la apoptosis inducida por derivados de fenilbenzo- γ -pironas.

Aunque la mayoría de las publicaciones apoyan la idea que JNK contribuye a la apoptosis inducida por estrés, su efecto parece depender del tipo celular y del contexto de otras señales recibidas por la célula. La duración de la activación de JNK puede ser un factor determinante en la decisión entre proliferación celular *versus* muerte celular. La activación persistente de esta proteína quinasa (>1-2 h) parece ser necesaria para inducir muerte celular, pero esto no ocurre en todos los casos, tal y como se ha descrito para el ajoeno, un compuesto organosulfurado que induce apoptosis en células promielocíticas. La activación de la p38^{MAPK} está implicada en la apoptosis en una variedad de tipos celulares, inducida por falta de factores de crecimiento, isquemia y estrés oxidativo. Una combinación de compuestos que activen rutas apoptóticas con reactivos que activen señales apoptóticas adicionales, o que inhiban señales de supervivencia, pueden suministrar una base molecular racional para nuevas estrategias quimioterápicas.



Esquema simplificado de los principales miembros de las cascadas MAPK que desempeñan diferentes papeles en la regulación de la muerte celular. TNF: factor necrótico tumoral.

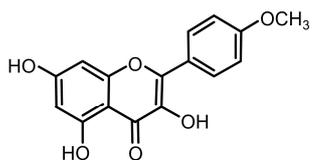
Precisamente la publicación de la evaluación antitumoral de veintidós compuestos con el núcleo fenilbenzo- γ -pirona en el *European Journal of Pharmacology* [5] sentó las bases para el estudio de derivados metilados de flavonoides. En los resultados previos con productos naturales y semi-sintéticos, demostramos que la metilación del grupo hidroxilo en la posición C3 de la quercetina genera un compuesto con mayor actividad antiproliferativa en varias líneas celulares tumorales. Esto permitió concebir y profundizar en el mecanismo de acción citotóxico de un derivado acetilado y metilado de la quercetina (**20**) que se publicó en la revista especializada *Carcinogenesis* [6]. Los estudios de citometría de flujo indican que este derivado de la quercetina altera la progresión del ciclo de las células de leucemia humana HL-60 y U937,

parando en la fase G₂-M, e induce apoptosis a través de un mecanismo dependiente de caspasas que implica el procesamiento de las caspasas-3,-6,-7 y -9, la liberación de citocromo c y la hidrólisis de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa. Además, la sobre-expresión de las proteínas protectoras mitocondriales Bcl-2 y Bcl-x_L no confiere resistencia a la apoptosis inducida por el derivado de la quercetina. El tratamiento de las células leucémicas con este compuesto induce la activación de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y la combinación con inhibidores de MEK (MAP quinasa / ERK quinasa, 1/2) potencian la muerte celular. Este trabajo mereció el Premio del Instituto Canario de Investigación del Cáncer de la Real Academia de Medicina de Santa Cruz de Tenerife al mejor trabajo sobre cáncer, básico o clínico, publicado en revista, nacional o extranjera en el año 2007, concedido el año 2009.

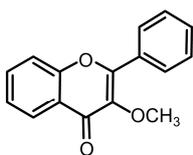
De los resultados previos publicados en el *European Journal of Pharmacology*, seleccionamos quince flavonoides obtenidos de fuentes comerciales (**31** al **45**) para estudios de citotoxicidad en células leucémicas humanas. Los resultados obtenidos se presentaron en el congreso internacional de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO, septiembre de 2010). Así mismo, se han publicado los resultados en revistas internacionales tal y como se detalla más adelante.

Como continuación de nuestros estudios, hemos evaluado otros derivados glicosilados de la quercetina y el kaempferol (**46** al **55**) en células de leucemia (HL-60 y U937) y de melanoma (SK-MEL-1) humanas. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Instituto de Bio-Organica "Antonio González" de La Laguna y el Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University (EEUU) y los resultados se publicaron en la revista *Planta Médica* [7].

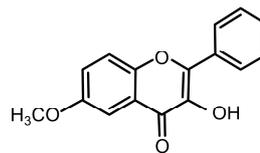
Evaluación de flavonoides sobre la viabilidad y proliferación de las células leucémicas humanas.



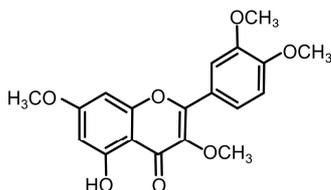
3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (31)



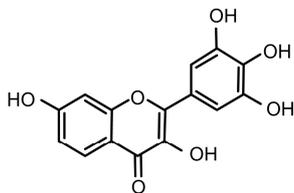
3-metoxiflavona (32)



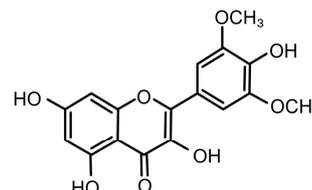
6-metoxiflavonol (33)



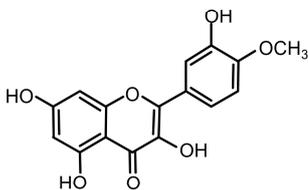
3,7,3',4'-tetrametiléter de quercetina (34)



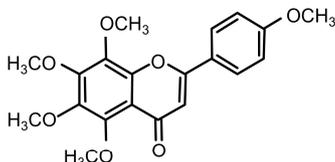
Robinetina (35)



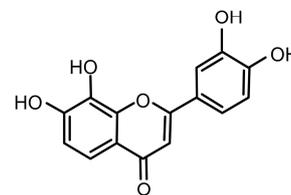
Syringetina (36)



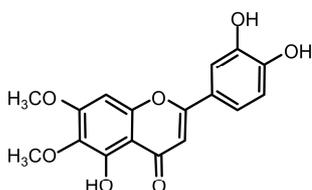
Tamarixetina (37)



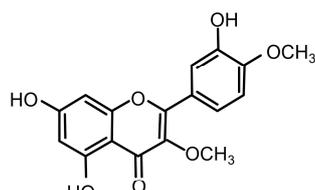
Tangeretina (38)



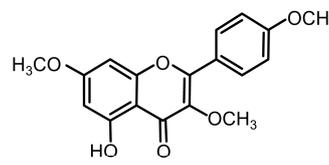
3',4',7,8-tetrahidroxiflavona (39)



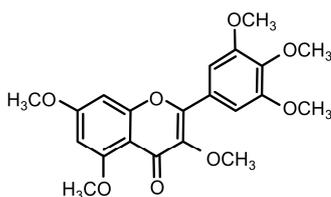
3',4',5-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (40)



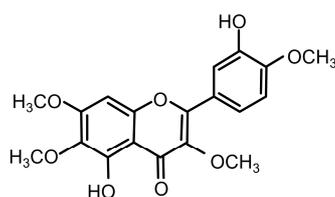
3',5,7-trihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (41)



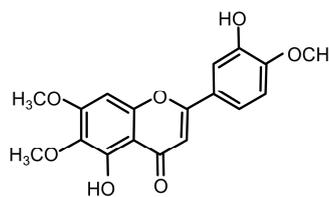
3,7,4'-trimetiléter de kaempferol (42)



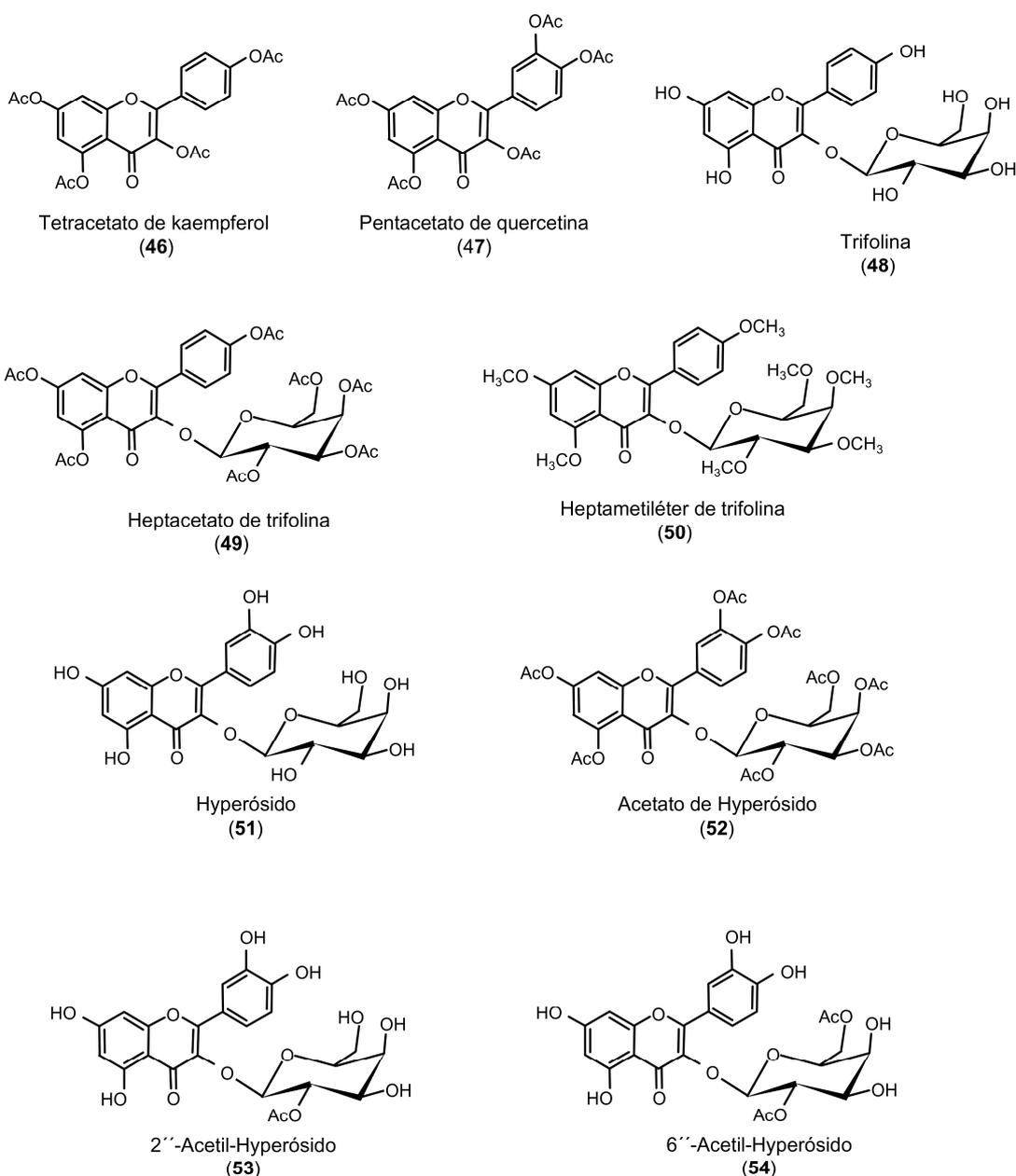
3,5,7,3',4'-tetrametiléter de quercetina (43)



Casticina (44)



Eupatorina (45)

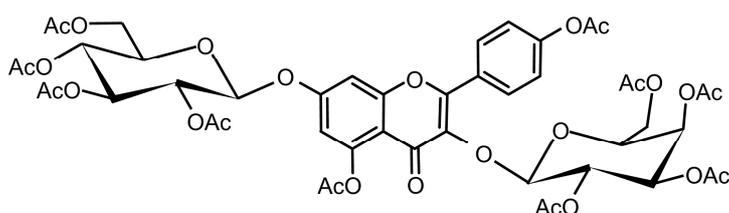


Este trabajo constituyó la base para investigar el mecanismo antiproliferativo del acetato de trifolina, derivado acetilado y glicosilado del kaempferol (kaempferol-3-*O*-galactósido) (49). Este compuesto induce apoptosis por un mecanismo dependiente de caspasas, asociada con la liberación de citocromo c mitocondrial y bloqueada por la expresión aumentada de las proteínas mitocondriales Bcl-2 y Bcl-x_L. La muerte de las células leucémicas está mediada por la vía intrínseca e implica la mitocondria y la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y es independiente de la generación de las especies reactivas de oxígeno. Los resultados de estos estudios fueron publicados en la revista especializada *Apoptosis* en el año 2008 [8].

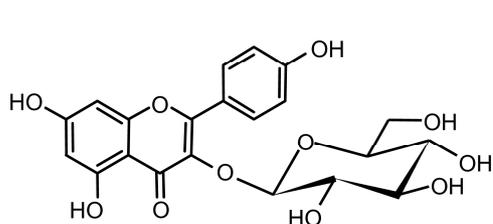
La ruta Jun quinasa (SAPK/JNK) puede ser activada también por ceramida, segundo mensajero lipídico que se origina por hidrólisis de la esfingomielina, e inducir apoptosis. Así, conocidos inductores de apoptosis como el Factor Necrótico Tumoral (TNF α), la daunorubicina, y las situaciones de estrés (choque térmico, radiación UV-B y gamma, infecciones bacterianas) aumentan los niveles intracelulares de ceramida, lo que sugiere que esta molécula señal desempeña un importante papel como mediador o regulador de la muerte celular. Se han definido dos rutas principales para la generación de ceramida: la hidrólisis de esfingomielina y la biosíntesis *de novo*. La primera tiene lugar por la acción de esfingomielinasas, que operan a diferentes pH óptimos y poseen diferentes requerimientos de iones metálicos. La activación de la esfingomielinasa ácida se ha observado en respuesta a la radiación UV-A, a la estimulación del receptor de neurotropina p75, del CD28, por TNF α y CD95. La activación de la esfingomielina neutra también se ha descrito después de la estimulación del receptor neurotropina p75, radiación, choque térmico, eliminación de suero y el tratamiento con vitamina D. En cambio, la biosíntesis *de novo* de ceramida está regulada por la acción de la serina palmitoiltransferasa, primera enzima de la ruta biosintética. La acumulación de ceramida a través de esta vía tiene lugar después del tratamiento con ácido retinoico en células GH4C1, con daunorubicina en células P388 y U937 y con etopósido en células Molt-4. Debido a que el ciclo de la esfingomielina desempeña un papel importante en la transducción de la señal apoptótica, el estudio de la participación del ciclo de la esfingomielina ha constituido otro de nuestros objetivos.

La investigación del efecto de los metiléteres de flavonoides sobre la proliferación y la viabilidad de las líneas de leucemia humana ha dado lugar a varias publicaciones durante el año 2010 en la revista especializada *Molecular Carcinogenesis*. En la primera de ellas [9] describimos que el metiléter (**15**) presenta propiedades citotóxicas en varias líneas de leucemia humana (U937, K-562, THP-1, Jurkat y Molt-3) y en células que expresan niveles elevados de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L. Los potentes efectos sobre la viabilidad celular son consecuencia de una parada del ciclo celular en la fase G₂-M, que está asociada a cambios en la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo p21^{Cip1} y ciclina B₁. Además, este flavonoide inhibe la polimerización de tubulina y activa las vías de señalización de las MAPKs y el ciclo de la esfingomielina. Precisamente, la generación de ceramida se lleva a cabo por la activación de una de las isoformas de esfingomielinasa, la esfingomielinasa ácida. Además, la muerte celular desencadenada por el metiléter (**15**), es significativamente bloqueada por un inhibidor específico de JNK/SAPK, indicando que la activación de esta MAPK está implicada en la muerte celular. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

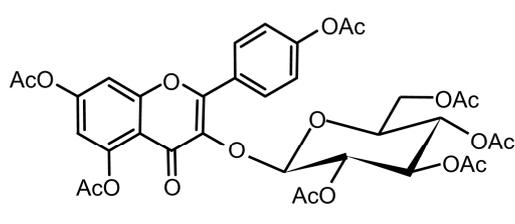
En la segunda aportación estudiamos los efectos citotóxicos del derivado flavonoide 5,7,3'-trihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (**41**) [10] en nueve líneas celulares tumorales (HL-60, HL-60/neo, HL-60/Bcl-x_L, U-937, U-937/Bcl-2, Jurkat, Molt-3, SK-MEL-1 y A549) y encontramos que es particularmente eficiente frente a las líneas de leucemia humana. La muerte celular inducida implica la activación de múltiples caspasas (caspasa-3, -6, -7 y -9), la inactivación del enzima de reparación del ADN poli-(ADP-ribosa)-polimerasa y es parcialmente bloqueada por niveles elevados de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L. La vía de señalización MAPK también es activada en respuesta a este flavonoide y la muerte celular es atenuada por inhibición de las proteínas quinasas SAPK/JNK y ERK 1/2. Además, este compuesto inhibe la proliferación de células leucémicas en ratones atímicos [11]. Estas investigaciones se publicaron en los años 2010 y 2011, y constituyó parte de una Tesis Doctoral que mereció el premio extraordinario de Doctorado y premio a la mejor Tesis Doctoral por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en el área de Ciencias de la Salud (año 2010).



Decaacetato de glucotrifolina
(**55**)



Astragalina (**56**)

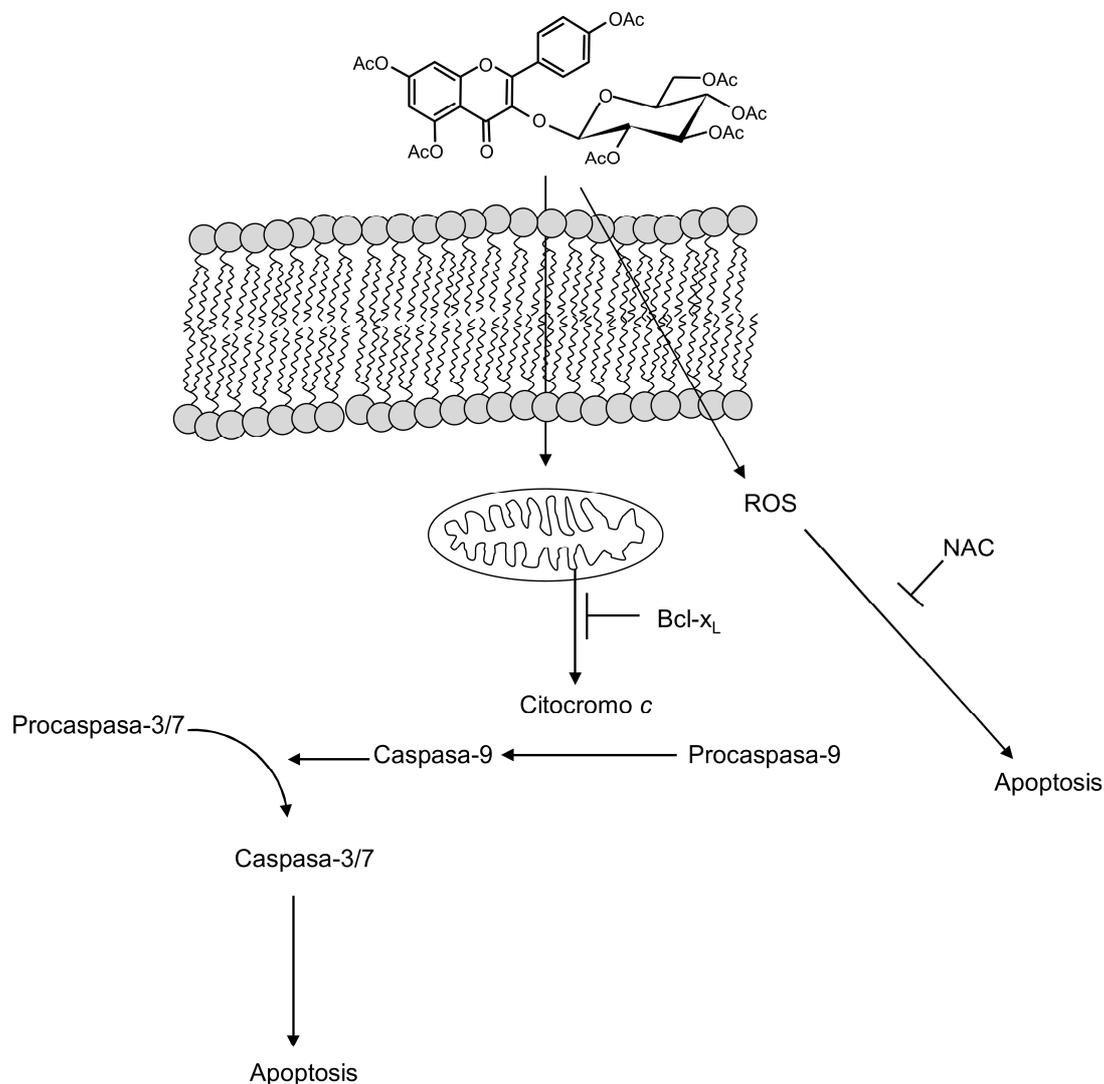


Heptacetato de astragalina (**57**)

La complejidad en la estructura de flavonoides (**55**) no estuvo asociada con un aumento en la citotoxicidad en las células de leucemia humana HL-60 [7].

En el mes de octubre de 2011 en la revista *Cancer Letters* se presentan los resultados de los efectos de un derivado acetilado de la astragalina (**57**) en células leucémicas HL-60. Este compuesto induce muerte celular que es bloqueada por los inhibidores generales de caspasas y

por el antioxidante *N*-acetil-L-cisteína, poniendo de manifiesto que las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel crucial en su mecanismo de citotoxicidad [12].



Las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel crucial en el mecanismo de muerte desencadenado por el compuesto **57**. NAC: *N*-acetil-L-cisteína.

Los estudios presentados aquí abren nuevas perspectivas de investigación en las vías de señalización implicadas en la muerte de las células leucémicas humanas y sugieren que algunos de los compuestos descritos podrían ser útiles para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la lucha contra el cáncer.

Francisco Estévez, José Quintana, María Teresa Marrero, Gledy Negrín, Olga Burmistrova, Sara Estévez, Sara Rubio, Fernando Torres, Fabio Nicolini, Jorge Triana, José L. Eiroa, Mariana López, Francisco J. Pérez, Jesús G. Díaz, Francisco León, Ignacio Brouard, Jaime Bermejo

2. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer, el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-62536) y Ministerio de Ciencia e Innovación y FEDER (SAF2010-21380). S.E., M.T.M. y F.T. han sido becarios del Ministerio de Educación, de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y de la Consejería de Educación del Gobierno de Canarias, respectivamente.

3. REFERENCIAS

[1] Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 673-751.

[2] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut* 2002; **96**: 67-202.

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

[4] Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**: 19-34.

[5] Rubio S, Quintana J, López M, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. *Eur J Pharmacol.* 2006; **548**: 9-20.

[6] Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis.* 2007; **28**: 2105-2113.

[7] Díaz JG, Carmona AJ, Torres F, Quintana J, Estévez F, Herz W. Cytotoxic activities of flavonoid glycoside acetates from *Consolida oliveriana*. *Planta Med.* 2008; **74**: 171-174.

[8] Torres F, Quintana J, Díaz JG, Carmona AJ, Estévez F. Trifolin acetate-induced cell death in human leukaemia cells is dependent on caspase-6 and activates the MAPK pathway. *Apoptosis* 2008; **13**: 716-728.

[9] Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Betuletol 3-methyl ether induces G₂-M phase arrest and activates the sphingomyelin and MAPK pathways in human leukaemia cells. *Mol Carcinog* 2010; **49**: 32-43.

[10] Torres F, Quintana J, Estévez F. 5,7,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone-induced cell death in human leukaemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway. *Mol Carcinog* 2010; **49**: 464-475.

[11] Torres F, Quintana J, Estévez F. 5,7,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone inhibits the tubulin polymerization and activates the sphingomyelin pathway. *Mol Carcinog* 2011; **50**: 113-122.

[12] Burmistrova O, Quintana J, Díaz JG, Estévez F. Astragalin heptaacetate-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway. *Cancer Lett.* 2011; **309**: 71-77.