

ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS BASADAS EN PRODUCTOS NATURALES, ALTERNATIVA EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

Carolina P. Reyes^{1,2}, Francisco Muñoz-Martínez³, Gabriel G. Llanos^{1,2}, Marvin J. Núñez^{1,2,4}, Ivan R. Torrecillas⁵, Liliana M. Araujo^{1,6}, Ignacio A. Jiménez^{1,2}, Santiago Castanys³, Laila Moujir^{1,6}, Mercedes Campillo⁵, Francisco Gamarro³, Isabel L. Bazzocchi^{1,2}

¹ Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

² Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, Universidad de La Laguna, Avenida Astrofísico Francisco Sánchez, 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain.

³ Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

⁴ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, Final ave. Héroes y Mártires del 30 Julio, San Salvador, El Salvador.

⁵ Laboratorio de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain.

⁶ Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna, Avenida Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

ÍNDICE:

- 1. INTRODUCCIÓN**
 - 2. REVERTIDORES DE LA MULTIRESISTENCIA A FÁRMACOS**
 - 3. METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA**
 - 3.1 Metabolitos citotóxicos de especies de Celastraceae
 - 3.2 Metabolitos citotóxicos de especies del género *Whitania*
 - 4. CONCLUSIONES**
 - 5. BIBLIOGRAFÍA**
-

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales representan la fuente más abundante de inspiración para la identificación de estructuras novedosas (Newman y Cragg, 2010) dada su amplia diversidad estructural y biológica, que los hace idóneos como base para el diseño racional de fármacos (Saklani y Kutty, 2008). Constituyen, sin lugar a dudas, un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevas entidades químicas con potencial terapéutico (Kinghorn y *col.*, 2011), ya que pueden considerarse *estructuras privilegiadas* (Costantino y Barlocco, 2006) que han sido seleccionadas por la evolución por su capacidad de interactuar con múltiples receptores y por lo tanto, exhibir múltiples actividades biológicas.

Los productos naturales, análogos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos, representan el 50% de los fármacos que existen actualmente en uso clínico, especialmente en el área del cáncer (Pfisterer y *col.*, 2010). Como ejemplos clásicos podemos citar: taxol, camptotecina o los alcaloides de la *Vinca* (vinblastina y vincristina) (Figura 1). Actualmente, se encuentran en fase clínica para el tratamiento de algún tipo de cáncer otros productos naturales aislados de plantas o bien análogos, entre los que podemos citar: el agente antimicótico, análogo de taxol, ABI-007 (suspensión, American Biosciences); el inhibidor de la topoisomerasa I, análogo de camptotecina, diflomotecan (BN-80915) 100 (Ipsen); la homoharringtone (ChemGenex), inhibidor de la síntesis de proteínas o el inductor de caspasas, el protopanaxadiol (PanaGin) (Saklani y Kutty, 2008).

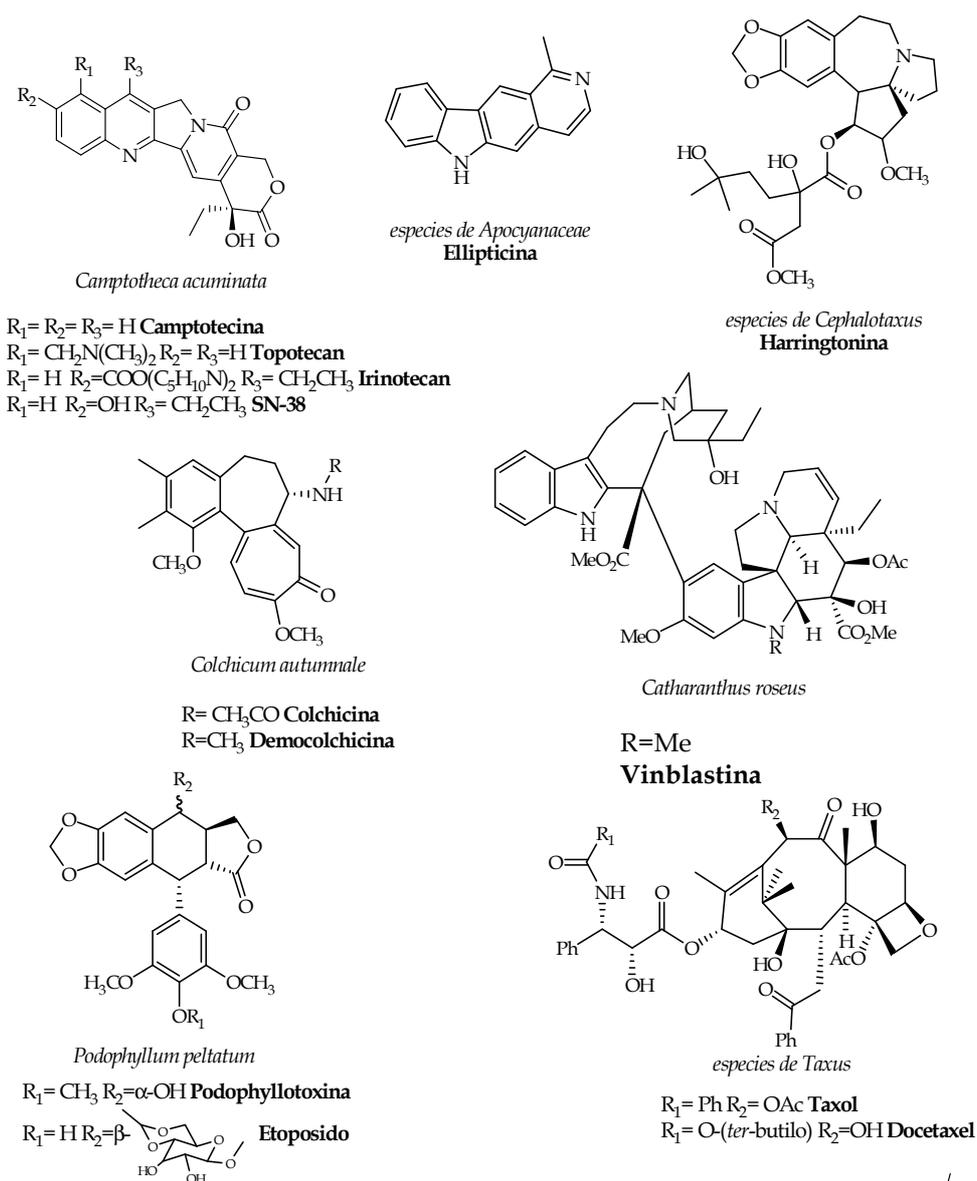


Figura 1. Productos Naturales con actividad anticancerígena.

En el marco de nuestra investigación, uno de nuestros objetivos es la búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos de origen vegetal. En esta línea, en el presente estudio se revisan los principales resultados obtenidos en la búsqueda de potenciales agentes anticancerígenos, a través de una estrategia multidisciplinar.

2. REVERTIDORES DE LA MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS

La multirresistencia a fármacos (MDR, *Multi-Drug Resistance*) (Lage, 2008), resistencia intrínseca o adquirida a fármacos que difieren en estructura química, mecanismo de acción y diana molecular, es la causa del fallo en el tratamiento de alrededor del 90% de los pacientes con cáncer metastático (Longley y Johnston, 2005).

Entre los mecanismos celulares implicados en la MDR destaca la sobreexpresión de la glicoproteína-P (Pgp), proteína transportadora ATP-dependiente perteneciente a la superfamilia de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) (Gottesman y *col.*, 2002), la mejor estudiada y, hasta el momento, la única cuya implicación clínica se ha demostrado, ya que se encuentra sobreexpresada en el 50% de los tumores multirresistentes (Leonard y *col.*, 2003).

La reversión del fenotipo MDR, o quimiosensibilización a la quimioterapia, implica la administración conjunta de un inhibidor de la Pgp con un fármaco o fármacos, incrementándose la acumulación intracelular de los agentes terapéuticos al inhibir la actividad de la proteína transportadora. Desde la identificación del primer compuesto capaz de revertir el fenotipo MDR, el verapamilo en el año 1981, se han descrito centenares de compuestos capaces de modular la función Pgp, al menos *in vitro*, que pertenecen a diferentes familias químicas (Tsuruo y *col.*, 1981).

Actualmente, están en fase clínica los inhibidores de la Pgp de tercera generación, potentes inhibidores altamente específicos que han sido el resultado del diseño racional de fármacos basado en estudios de relación estructura-actividad (Krishna y Mayer, 2000). Estos inhibidores son: biricodar (VX-710), tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), elacridar (GF120918), laniquidar (R101933) y OC144-093. Sin embargo, hasta la fecha, ningún compuesto con actividad quimiosensibilizadora ha mostrado ser clínicamente útil, incrementando los índices de curación o los tiempos de supervivencia en los pacientes tratados, debido a su ineficacia *in vivo* o principalmente, a su toxicidad intrínseca o a la de los fármacos administrados conjuntamente (Robert y Jarry, 2003).

Por lo tanto, la identificación de compuestos revertidores más específicos, potentes, no transportados y menos tóxicos para el paciente continúa siendo prioritario para tratar de revertir el fenotipo MDR mediado por la Pgp.

Los sesquiterpenos de la familia *Celastraceae* (Gao y *col.*, 2007) constituyen un grupo de metabolitos secundarios que, en ensayos previos, mostraron revertir la MDR en cepas de *Leishmania* (Pérez-Victoria y *col.*, 2001; Cortés-Selva y *col.*, 2004). Sin embargo, su efecto en cáncer y su mecanismo molecular de reversión no había sido caracterizado (Figura 2).

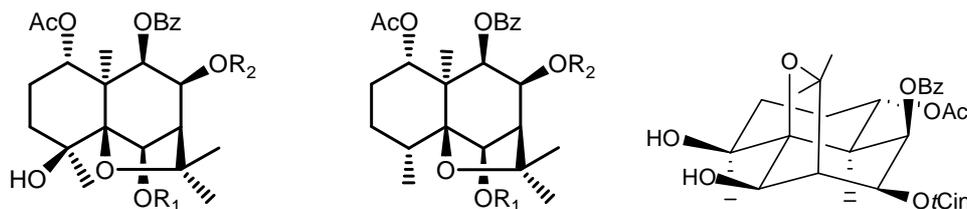


Figura 2. Sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos revertidores de la multirresistencia a fármacos.

Continuando nuestra investigación dirigida hacia la búsqueda de nuevos agentes revertidores de la MDR en cáncer, se evaluó la capacidad de revertir el fenotipo MDR dependiente de la Pgp y se elucidó el mecanismo molecular de acción de 28 sesquiterpenos, aislados de diversas especies del género *Maytenus* (*Celastraceae*) (Muñoz-Martínez y col. 2004). Los ensayos de citotoxicidad, usando células NIH-3T3 transfectadas con el gen humano MDR1, permitieron seleccionar los compuestos más potentes en revertir *in vitro* la resistencia a daunomicina y vinblastina. Los experimentos de citometría de flujo mostraron que éstos compuestos inhiben específicamente la actividad transportadora de la Pgp de manera saturable y dependiente de la concentración (k_i inferior a $0,24 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$), pero no la de otros transportadores capaces de conferir MDR (ABCC1, ABCC2 y ABCG2).

Así mismo, éstos sesquiterpenos inhiben el transporte mediado por la Pgp de [³H]colchicina y tetrametilrosamina en la membrana plasmática de células CH^RB30 y proteoliposomas enriquecidos con Pgp a concentraciones micromolares, resultados que sustentan que la Pgp es la diana molecular para estos compuestos. Los ensayos de marcaje de fotoafinidad en membrana plasmática y experimentos de espectroscopia de fluorescencia con proteínas purificadas sugieren que estos metabolitos interactúan con dominios transmembrana de la Pgp. Además, modulan la actividad ATPasa de la Pgp de manera bifásica y dependiente de la concentración, estimulándola a muy bajas concentraciones, pero se comportan como inhibidores no competitivos de la actividad ATPasa a altas concentraciones.

En sucesivos estudios, se llevó a cabo la evaluación de otros 20 sesquiterpenos, tanto naturales como semisintéticos, presentando seis de ellos una eficacia similar al verapamilo, modulador clásico de la Pgp, en revertir la resistencia a daunorubicina e incluso dieciséis veces mayor que el verapamilo en revertir la resistencia a vinblastina (Muñoz-Martínez y col. 2005).

Estos sesquiterpenos con esqueleto de dihidro-β-agarofurano poseen una *estructura privilegiada*, que les confiere la capacidad de interactuar con la Pgp e inhibirla en diferente grado de eficacia dependiendo de los diferentes grupos presentes en el esqueleto básico. Así, un detallado estudio de la relación estructura-actividad permitió establecer que: a) el nivel total

de esterificación del compuesto, b) la presencia de dos ésteres aromáticos y c) la regiosustitución de los diferentes sustituyentes en la molécula, son elementos fundamentales para la afinidad de este tipo de compuestos por la Pgp, y a diferencia de otros agentes revertidores, la presencia de un átomo de nitrógeno terciario no es esencial para la actividad revertidora de la MDR (Torres-Romero y *col.* 2009).

Con el fin de profundizar en las bases estructurales responsables de la actividad inhibidora de estos sesquiterpenos y sentar las bases para el diseño de inhibidores de la Pgp más potentes, se desarrolló un modelo 3D-QSAR, de 78 de estos compuestos, haciendo un análisis CoMSIA (Reyes y *col.* 2007). Los resultados obtenidos indican que los requisitos estructurales más relevantes para la expresión de la actividad se encuentran en torno a los grupos carbonilo situados sobre los carbonos 2, 3 y 8, que actúan como aceptores de enlaces de hidrógeno en las interacciones con el receptor, lo que resulta fundamental para la eficacia de estos sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp. Las interacciones poco polares e hidrofóbicas, a través de residuos aromáticos en segmentos transmembrana de la Pgp parecen jugar un importante papel en el proceso de reconocimiento.

En general, los sesquiterpenos presentan valores bajos de toxicidad intrínseca (<30%) en las líneas celulares, cuando éstos se comparan con el verapamilo. Sin embargo, cabe destacar que los sesquiterpenos presentaron una toxicidad similar entre la línea NIH-3T3 MDR1 y la línea NIH-3T3, sensible a fármacos. Estos datos nos sugieren que la Pgp no confiere resistencia a los sesquiterpenos, es decir, que éstos no son transportados por la proteína o son sustratos pobres de la Pgp.

Estos estudios revelan que los sesquiterpenos aislados de celastráceas, dado su potente actividad revertidora de la MDR y especificidad por la Pgp, son prometedores moduladores de la Pgp con potencial aplicación en la quimioterapia del cáncer.

3. METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA

El cáncer engloba a un complejo y heterogéneo grupo de patologías, en las que las células proliferan descontroladamente e invaden y dañan los tejidos vecinos. La quimioterapia se basa fundamentalmente en el uso de fármacos con actividad antiproliferativa, siendo los compuestos más utilizados hoy en día los que pertenecen al grupo de los citotóxicos (Chabner y Roberts, 2005).

3.1. Metabolitos citotóxicos de especies de Celastraceae

En especies de la familia *Celastraceae* se han identificado diversos metabolitos con actividad citotóxica. Así, la triptolida, un diterpeno triepoxidado, se ha descrito como un potente

antitumoral, presentándose como un inhibidor de la angiogénesis en varios ensayos (He y *col.*, 2010). A los celastroloides, indicadores quimiotaxonómicos de la familia que engloban a los nortriterpeno metilénquinonas, derivados fenólicos y dímeros y trímeros triterpénicos, se les atribuye un gran número de actividades biológicas, incluyendo sus propiedades anticancerígenas (Ravelo y *col.*, 2004). Así, la tingenona, presenta actividad citotóxica frente a las líneas celulares Hep-G2, H-4-II y SK-Mel-28 con CI_{50} de 1,9; 2,7 y 1,7 μ M, respectivamente (Setzer y *col.*, 2001) y el celastrol ha sido ampliamente estudiado, identificándose, recientemente, nuevas dianas en su mecanismo de acción (Raja y *col.*, 20011) (Figure 3).

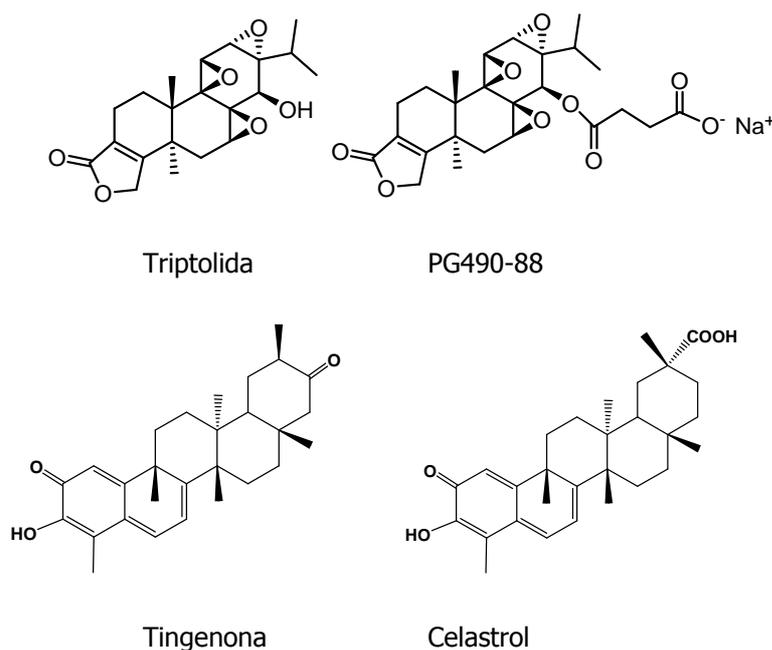


Figura 3. Metabolitos con propiedades anticancerígenas: diterpenos y celastroloides aislados de celastráceas.

En esta línea de investigación, en la búsqueda de compuestos con potencial anticancerígeno (Moujir y *col.*, 2007; Moujir y *col.*, 2008), llevamos a cabo el estudio de una serie de triterpenos pentacíclicos de la serie del lupano (Reyes y *col.*, 2006), así como de nortriterpeno fenoles, aislados de diversas especies del género *Maytenus* (Núñez y *col.*, 2005). Las células empleadas para llevar a cabo los experimentos proceden de líneas celulares establecidas a partir de carcinoma epitelial de cuello de útero humano (células HeLa), carcinoma de laringe humano (Hep-2) y células no tumorales (Vero, células de riñón de mono verde africano), con el objetivo de determinar la especificidad de los compuestos. La actividad se determinó usando el método colorimétrico de Mosmann (Mosmann, 1983), que se basa en la capacidad que poseen las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltrazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio) por medio de la succinato deshidrogenasa existente en las mitocondrias. El triterpeno de la

serie del lupano más activo fue el ácido 3-*epi*-betulínico con una CI_{50} de 1,8 y 8,9 $\mu\text{g/ml}$ frente a HeLa y Hep-2, respectivamente, tras 48 horas de exposición. Cabe destacar, que la actividad se incrementó aproximadamente tres veces cuando las células Hep-2 estaban dividiéndose activamente (CI_{50} 3,1 $\mu\text{g/ml}$). El 28,30-dihidroxi-3-oxolup-20(29)-ene presentó, así mismo, una actividad moderada (CI_{50} de 4,0 y 7,1 $\mu\text{g/ml}$ frente a HeLa y Hep-2, respectivamente) (Figura 4). Los estudios de relación-estructura actividad revelaron que en este tipo de compuestos la presencia de un grupo hidroxilo sobre el carbono C11 es relevante para la expresión de la actividad, la estereoquímica β del grupo hidroxilo sobre el carbono C3 disminuye la toxicidad, mientras que un grupo hidroxilo en C28 hace que disminuya la actividad citotóxica.

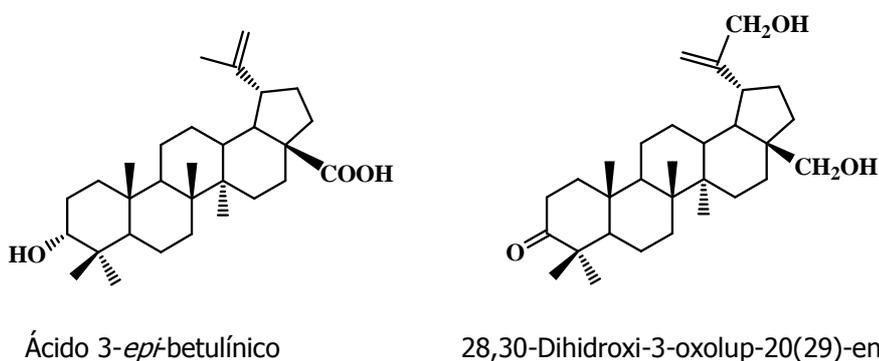


Figura 4. Triterpenos de la serie del lupano aislados de celastráceas con actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares tumorales.

En lo que a nor-triterpenometilén fenoles se refiere, el 8-*epi*-6-deoxoblepharodol (CI_{50} 1,6 y 5,9 $\mu\text{g/ml}$ frente HeLa y Hep-2, respectivamente) y pristimerol (CI_{50} 0,5 y 2,8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) resultaron incluso más activos frente a ambas líneas celulares que la mercaptopurina usada como control, aunque mostraron, así mismo, una cierta toxicidad frente a la línea no tumoral Vero (2,2 y 1,4 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 5) (Rodríguez y *col.*, 2005).

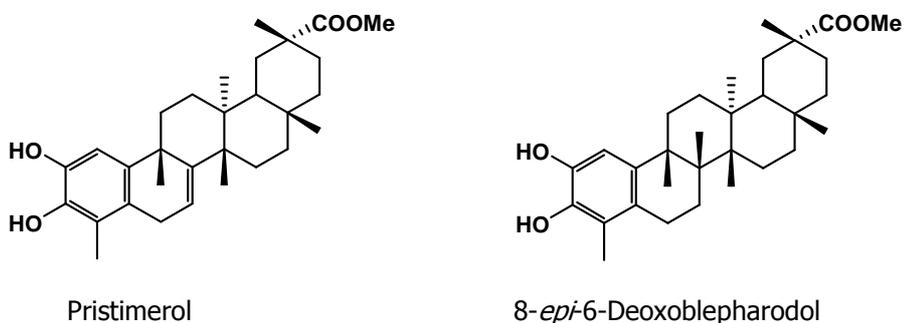


Figura 5. Triterpeno fenoles aislados de celastráceas con actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares tumorales.

3.2. Metabolitos citotóxicos de especies del género *Withania*

El potencial terapéutico de especies del género *Withania* (Solanaceae) se atribuye a la presencia de withanolidas, lactonas esteroidales con un esqueleto de ergostano de 28 carbonos (Chen y col., 2011). Withaferina A, prototipo de este tipo de compuestos naturales, ha sido ampliamente estudiado por su efectividad para inducir apoptosis, revelándose como un potencial fármaco anticancerígeno (Yu y col., 2010).

En el curso de nuestra investigación en la búsqueda de metabolitos bioactivos de especies endémicas de las Islas Canarias, iniciamos el estudio de *Withania aristata* (Ait.) Pauq. (*Solanaceae*), conocida tradicionalmente como *oroval* y ampliamente usada en la medicina tradicional por sus numerosas aplicaciones, incluyendo su uso como antitumoral, antirreumático y antiespasmódico (Cruz, 2007). Así, tras la preparación de diversos extractos, haciendo uso de disolventes de distinta polaridad y la posterior evaluación de su citotoxicidad, seleccionamos el extracto de diclorometano de las hojas (CI₅₀ de 11,7 y 19,9 µg/ml frente a HeLa y A-549, respectivamente) para su posterior estudio fitoquímico (Llanos y col. 2010). En dicho estudio se aíslan siete nuevas withanolidas, así como tres descritas anteriormente y se preparan dos derivados, compuestos que fueron evaluados frente a las líneas celulares tumorales: HeLa (carcinoma epitelial de cuello de útero humano), A-549 (carcinoma humano de pulmón) y MCF-7 (células de cáncer de mama). El derivado (4*S*,20*R*,22*R*)-27-acetoxi-4-*p*-bromobenzoiloxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida (**2**) mostró citotoxicidad frente a todas las líneas celulares ensayadas con valores de CI₅₀ de 2,8-3,6 µM, mientras que el (4*S*,20*R*,22*R*)-4,27-diacetoxi-4-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida (**1**) exhibió una CI₅₀ de 5,4 µM frente a línea celular MCF-7 (Figure 6). El estudio preliminar de los requisitos estructurales para la expresión de la actividad están en línea con resultados previos que señalan la relevancia de los sistemas 4β-hydroxi-2-en-1-ona y 5β,6β-epoxi en este tipo de compuestos para su potencial anticancerígeno (Damu y col. 2007).

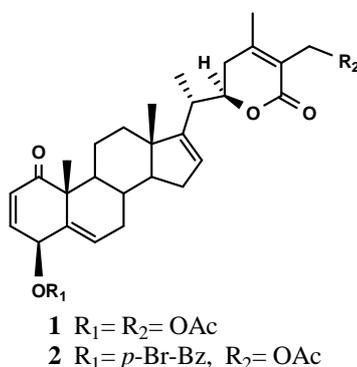


Figura 6. Withanolidas aisladas de *Withania aristata* con actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales: HeLa, A-549 y MCF-7.

4. CONCLUSIONES

Las *estructuras privilegiadas* basadas en productos naturales, dada su amplia diversidad estructural y biológica constituyen, sin lugar a dudas, una excelente fuente de nuevas entidades químicas con potencial terapéutico y una sólida base para el diseño racional de fármacos anticancerígenos.

Nuestras investigaciones revelan que *estructuras privilegiadas* tipo sesquiterpeno dihidro- β -agarofurano, con una potente actividad revertidora de la MDR en cáncer y tipo withanolida, con excelente actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares tumorales, son prometedores agentes con potencial aplicación en la quimioterapia del cáncer.

Nuestros esfuerzos, en el futuro, estarán dirigidos a profundar en los mecanismos moleculares de acción de estos sesquiterpenos y establecer los requisitos estructurales de las withanolidas, que permitan el diseño racional de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5:65-72.
- Chen L-X, He H, Qiu F. Natural withanolides: an overview. *Nat. Prod. Rep.*, 2011; 28:705-740.
- Cortés-Selva F, Campillo M, Reyes C P, Jiménez, IA; Castanys S, Bazzocchi IL, Pardo L, Gamarro F, Ravelo AG. SAR studies of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (*Celastraceae*) as inhibitors of the multidrug-resistant phenotype in a *Leishmania tropica* line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J. Med. Chem.* 2004, 47:576-587.
- Costantino L, Barlocco D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13:65-85.
- Cruz SJ. Más de 100 plantas medicinales, medicina popular canaria Monografías. Ed. Obra Social La Caja de Canarias. 2007; 1-689.
- Damu AG, Kuo PC, Su CR, Kuo TH, Chen TH, Bastow KF, Lee KH, Wu TS. Isolation, structures, and structure-cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *J. Nat. Prod.* 2007; 70:1146-52.
- Gao J-M, Wu W-J, Zhang J-W, Konishi Y. The dihydro- β -agarofuran sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 2007; 24:1153-1189.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2:48-58.
- He MF, Huang YH, Wu LW, Ge W, Shaw PC, But PPH. Triptolide functions as a potent angiogenesis inhibitor. *Int. J. Cancer.* 2010; 126:266-278.
- Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H. The Relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod.* 2011; 74:1539–1555.
- Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 11:265-283.
- Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65:3145-3167.
- Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist.* 2003; 8:411-424.
- LLanos GG, Araujo LM, Jiménez IA, Moujir LM, Vázquez JT, Bazzocchi IL. Withanolides from *Withania aristata* and their cytotoxic activity. *Steroids.* 2010; 75:974-981.
- Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 2005; 205(2):275-292.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983, 65:55-63.
- Muñoz-Martínez F, Lu P, Cortés-Selva F, Pérez-Victoria JM, Jiménez IA, Ravelo AG, Sharom FJ, Gamarro F, Castanys S. Reverse cellular multidrug resistance that bind specifically to human P-glycoprotein and *Celastraceae* sesquiterpenes as a new class of modulators. *Cancer Res.* 2004; 64:7130-7138.
- Muñoz-Martínez F, Mendoza CR, Bazzocchi IL, Castanys S, Jiménez IA, Gamarro F. Reversion of human Pgp-dependent multidrug resistance by new sesquiterpenes from *Zinowiewia costaricensis*. *J. Med. Chem.* 2005; 48:4266-4275.

- Moujir L, Seca AML, Silva AMS, López MR, Padilla N, Cavaleiro AS, Neto CP. *Fitoterapia*. 2007; 78:385-387.
- Moujir L, Seca AML, Silva AMS, Barreto MC. *Planta Med*. 2008; 74:1-3.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as drugs and leads to drugs: the historical perspective *Nat. Prod. Chem. Drug Discov*. 2010; 3-27.
- Núñez M J, Reyes CP, Jiménez IA, Moujir L, Bazzocchi IL. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. *J. Nat. Prod*. 2005; 68:1018-1021.
- Pérez-Victoria JM, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jiménez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45:2468-2474.
- Pfisterer PH, Wolber G, Efferth T, Rollinger JM, Stuppner H. Natural products in structure-assisted design of molecular cancer therapeutics. *Curr. Pharm. Design*. 2010; 16:1718-1741.
- Raja SM, Clubb RJ, Ortega-Cava C, Williams SH, Bailey, Tameka A, Duan L, Zhao X, Reddi AL, Nyong AM, Natarajan A, Band V, Band H. Anticancer activity of celastrol in combination with ErbB2-targeted therapeutics for treatment of ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Biol. Ther*. 2011; 11(2):263-276.
- Ravelo AG, Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, Pérez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr. Top. Med. Chem*. 2004; 4:241-265.
- Reyes CP, Núñez M J, Jiménez IA, Busserolles J., Alcaráz MJ, Bazzocchi IL. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. *Bioorg. Med. Chem*. 2006; 14:1573-1579.
- Reyes CP, Muñoz-Martínez F, Torrecillas IR, Mendoza CR, Gamarro F, Bazzocchi IL, Núñez, MJ, Pardo L, Castanys S, Campillo M, Jiménez IA. Biological evaluation, structure-activity relationships, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies of dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as modulators of P-glycoprotein-dependent multidrug resistance. *J. Med. Chem*. 2007; 50(20):4808-4817.
- Robert J, Jarry C. Multidrug resistance reversal agents. *J. Med. Chem*. 2003; 46(23):4805-4817.
- Rodríguez FM, López MR, Jiménez IA, Moujir L, Ravelo AG, Bazzocchi IL. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. *Tetrahedron*. 2005; 61:2513-2519.
- Saklani A, and Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. 2008; 13(3/4):161-171.
- Setzer WN, Holland MT, Bozeman CA, Rozmus GF, Setzer MC, Moriarity DM, Reeb S, Vogler B, Bates RB, Haber WA. Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. *Planta Med*. 2001; 67:65-69.
- Torres-Romero D, Muñoz-Martínez F, Jiménez IA, Castanys S, Gamarro F, Bazzocchi IL. Novel dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as potent modulators of human P-glycoprotein dependent multidrug resistance. *Org. Biomol. Chem*. 2009; 7:5166-5172.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*. 1981; 41:1967-1972.
- Yu Y, Hamza A, Zhang T, Gu MC, Zou P, Newman B, Li YY, Gunatilaka AAL, Zhan GC, Sun DX. Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol*. 2010; 79:542-551.