

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE  
VEGETAL *Piper eriopodon* Y  
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
CITOTÓXICA**

**Diego Ricardo Muñoz Cendales**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2020



# **Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Piper eriopodon* y determinación de su actividad citotóxica**

**Diego Ricardo Muñoz Cendales**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ciencias Química**

Director:

PhD. Luis Enrique Cuca Suarez

Profesor Titular, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Bioprospección en agentes terapéuticos

Grupo de Investigación:

Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2020



*A Dios y a toda mi familia, especialmente a mi hermosa y pequeña Sofí, por hacerme entender lo que realmente importa en la vida...*



## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional de Colombia, por brindarme toda la formación académica durante estos largos años.

A COLCIENCIAS, por la beca 528-2011 para realizar mis estudios de Doctorado y a Colfuturo por la orientación oportuna y excelente administración de la beca.

A mi director de tesis, el profesor. Luis Enrique Cuca Suarez por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por compartir sus valiosos conocimientos, por su incondicional apoyo, confianza, dedicación, paciencia y amistad durante todos estos años en mi proceso de formación. Muchas gracias.

Al profesor Gonzalo Arboleda por permitirme realizar los ensayos de actividad biológica en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia y al profesor Adrián Sandoval por toda su orientación e invaluable aportes en la realización de los ensayos biológicos.

A los profesores Emilio Clementi y Davide Cervia por acogerme en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias Biomédicas y Clínicas del Hospital Universitario Luigi Sacco de la Universidad de Milano. A Francesca, Martina, Matteo, Silvia, Christiana, Clara y a todos los demás integrantes del grupo por todas sus enseñanzas, apoyo y colaboración durante mi pasantía en Italia.

A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA, por brindarme el tiempo para realizar mis estudios y la pasantía, especialmente a la Dra. Cheyron Castellanos por su infinita paciencia y apoyo.

Al profesor John Jairo Gómez por su valiosa amistad, paciencia y gran colaboración con el desarrollo de algunos de los análisis estadísticos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Fabián López por sus importantes comentarios, amable disposición, orientación y compromiso desde el comienzo del proyecto, no sólo en los ensayos computacionales sino también en todos los aspectos de este trabajo.

A los profesores Wilman Delgado, Mónica Ávila, Oscar Patiño y a todos mis amigos integrantes del grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos, por ser parte de mi vida durante todos estos años, especialmente a mi gran amiga Erika Plazas por su apoyo incondicional desde siempre.

A toda mi familia, especialmente a mis padres Aura y Ricardo, a Blanquita y Félix, a mi hermana Adriana, a Luz Natalia y a Fabio. Gracias a todos por sus grandes enseñanzas, generosidad y por estar conmigo en todos los momentos buenos y malos que vivimos durante estos años.

A mi esposa Viviana, por todo su amor, paciencia y apoyo durante todos estos largos e interminables días de trabajo. Gracias por estar a mi lado, por ser parte de mi vida y por comprender lo importante que era este proyecto para mí.

Finalmente, a mi pequeña Sofía: ¡Gracias por llenar mi vida de alegría, por iluminar mi camino con una sonrisa, por darme con un beso la fuerza para seguir siempre adelante, porque con una simple mirada cambiaste mi mundo, porque jamás en mi vida habrá algo más importante que tú, porque eres mi vida entera, gracias!!



## Resumen

En este trabajo, se evaluó el efecto citotóxico de diferentes especies colombianas del género *Piper*, por medio del ensayo del MTT en líneas celulares de cáncer humano A549 (pulmón), PC-3 (próstata) y MDA-MB-231 (mama). El extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon* presentó el mayor efecto citotóxico con valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 25 µg/mL; y su fraccionamiento llevó al aislamiento de nueve compuestos (**1-9**) de tipo alquenilfenol. Los compuestos **2, 3, 4, 5, 6, 7, 8** y **9** son reportados por primera vez y sus estructuras químicas fueron establecidas por medio del análisis detallado de sus datos espectroscópicos (IR; RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C 1D y 2D, HRESIMS) y la comparación con los datos reportados en la literatura. Todos los compuestos aislados mostraron tener propiedades citotóxicas en líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama) con valores de IC<sub>50</sub> en un rango de 1.78 a 40.14 µg/mL. Los compuestos **1, 2** y **3** presentaron el efecto citotóxico más potente y fueron adicionalmente evaluados en células tumorales A549 (pulmón) y PC-3 (próstata), así como en células no tumorales HUVEC y MCF10. El compuesto **3** fue el inhibidor más potente en la viabilidad celular, seguido de los compuestos **2** y **1** respectivamente. Adicionalmente, se determinó que los compuestos **1** y **2** inducen apoptosis por medio de permeabilización mitocondrial y activación de caspasas, mientras que el compuesto **3** induce muerte celular independiente de caspasas que involucra disfunción mitocondrial y una producción aberrante de especies reactivas de oxígeno (ROS). Finalmente, se realizaron estudios *in silico* con el fin de evaluar el potencial efecto antagonista sobre la proteína XIAP, encontrando que los tres compuestos evaluados podrían unirse al dominio BIR3 de la proteína XIAP. Estos resultados confirman el potencial farmacológico que tienen los compuestos aislados de *P. eriopodon* y permiten demostrar el papel fundamental que tiene la proteína XIAP en el control de tumores, proporcionando información importante sobre la participación de XIAP en mecanismos de muerte celular tanto dependientes como independientes de caspasas.

**Palabras clave:** Cáncer; Apoptosis; Muerte independiente de caspasas; XIAP; Alquenilfenoles; *Piper eriopodon*.

## Abstract

The cytotoxic effect of different Colombian *Piper* plants was determined by the MTT assay in human cancer cell lines A549 (lung), PC-3 (prostate) and MDAMB-231 (breast). The most potent cytotoxic effect was found in the leaves ethanolic extract of *P. eriopodon* with IC<sub>50</sub> values less than 25 µg/mL. After different chromatographic techniques, nine alkenylphenols (**1** - **9**) were isolated from the ethanolic extract of leaves from *P. eriopodon* and their molecular structures were identified by the analysis of the spectroscopic data (IR; NMR <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C 1D and 2D; HRESIMS), as well as by comparison of the spectral data with those reported in the literature. Of note, compounds **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8** and **9** were reported for the first time. All isolated compounds showed cytotoxicity against the human cancer cell lines U373 (glioblastoma) and MCF7 (breast) with IC<sub>50</sub> values in a range of 1.78 - 40.14 µg/mL. The higher cytotoxic effect of compounds **1**, **2** and **3** was also shown by MTT assay using additional cancer cell lines A549 (lung), PC-3 (prostate) and non-tumourigenic HUVEC and human breast MCF10 cells. Compound **1** was the most potent inhibitor of human cancer cell viability, followed by compounds **2** and **3** respectively. Compounds **1** and **2** induced apoptosis through mitochondrial permeabilization and caspase activation while compound **3** acted on cell fate via caspase-independent/non-apoptotic mechanisms, likely involving mitochondrial dysfunctions and aberrant generation of reactive oxygen species (ROS). Finally, *in silico* modelling and molecular approaches suggested that all molecules inhibit XIAP by binding to XIAP-BIR3 domain. The results confirm the therapeutic potential of isolated compounds from *P. eriopodon* and demonstrates that XIAP is a key determinant of tumor control, at the molecular crossroad of caspase-dependent/independent cell death pathways.

**Keywords:** Cancer; Apoptosis; Caspase independent cell death; XIAP; Alkenylphenols; *Piper eriopodon*.

# Contenido

	Pág
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XX</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1: Estado del arte</b> .....	<b>3</b>
1.1    Introducción.....	3
1.1.1    Compuestos de origen vegetal utilizados en el tratamiento del cáncer.....	3
1.1.2    Mecanismos de acción y quimiorresistencia.....	8
1.2    Apoptosis y Proteínas Inhibidoras de Apoptosis.....	10
1.3    Generalidades del género <i>Piper</i> .....	12
1.4    Bibliografía.....	15
<b>2. Capítulo 2: Screening de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer con diferentes especies del género <i>Piper</i></b> .....	<b>23</b>
2.1    Introducción.....	23
2.2    Materiales y Métodos.....	24
2.2.1    Material vegetal.....	24
2.2.2    Preparación de Extractos.....	24
2.2.3    Cultivos celulares.....	25
2.2.4    Ensayo de Citotoxicidad.....	25
2.2.5    Análisis estadístico.....	25
2.3    Resultados y Discusión.....	26
2.4    Conclusiones.....	32
2.5    Bibliografía.....	33
<b>3. Capítulo 3: Estudio fitoquímico de <i>P. eriopodon</i></b> .....	<b>35</b>
3.1    Introducción.....	35
3.2    Materiales y Métodos.....	36
3.2.1    Material vegetal.....	36
3.2.2    General.....	36
3.2.3    Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de <i>P. eriopodon</i> .....	37
3.2.4    Cultivos celulares.....	38
3.2.5    Ensayo de Citotoxicidad.....	38

3.3	Resultados y Discusión .....	39
3.3.1	Identificación estructural de los compuestos aislados.....	39
3.3.2	Determinación de la Actividad Citotóxica de los compuestos aislados en líneas celulares de cáncer humano .....	49
3.4	Conclusiones .....	53
3.5	Bibliografía.....	54
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4: Muerte celular inducida en líneas celulares de cáncer humano por los compuestos aislados de <i>P. eriopodon</i>.....</b>	<b>57</b>
4.1	Introducción.....	57
4.2	Materiales y Métodos.....	59
4.2.1	General .....	59
4.2.2	Cultivos celulares.....	59
4.2.3	Ensayo de Citotoxicidad .....	59
4.2.4	Ensayo TUNEL.....	60
4.2.5	Inmunofluorescencia .....	60
4.2.6	Citometría de flujo .....	61
4.2.7	Western Blot .....	61
4.2.8	Potencial de Membrana Mitocondrial .....	62
4.2.9	Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) .....	62
4.2.10	Modelado molecular .....	62
4.2.11	ARN de interferencia.....	63
4.2.12	PCR en Tiempo Real.....	63
4.2.13	Análisis Estadístico .....	64
4.3	Resultados y Discusión .....	64
4.3.1	Efectos citotóxicos de los compuestos aislados de <i>P. eriopodon</i> .....	64
4.3.2	Evaluación de los mecanismos de muerte celular .....	66
4.3.3	Proteína XIAP como blanco molecular de los compuestos aislados de <i>P. eriopodon</i> .....	77
4.4	Conclusiones.....	86
4.5	Bibliografía.....	86
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>93</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo A: Información suplementaria de los capítulos 3 y 4.....</b>	<b>99</b>

## Lista de figuras

Pág.

<b>Figura 1-1:</b> Vías intrínseca y extrínseca de activación de Apoptosis. La vía intrínseca se activa por un estímulo interno a través de la mitocondria. La vía extrínseca se activa por un estímulo externo a través de los receptores de muerte como FAS/TNF. ....	11
<b>Figura 2-1:</b> Curvas de viabilidad celular para la línea celular MDA-MB-231 frente a los extractos etanólicos de: <i>P. eriopodon</i> (hojas, inflorescencias y madera); <i>P. pesaresanum</i> (hojas); <i>P. cumanense</i> (hojas e inflorescencias); <i>P. bogotense</i> (hojas); <i>P. arboreum</i> (madera). ....	26
<b>Figura 2-2:</b> Curvas de viabilidad celular para la línea celular PC-3 frente a los extractos etanólicos de: <i>P. eriopodon</i> (hojas, inflorescencias y madera); <i>P. pesaresanum</i> (hojas); <i>P. cumanense</i> (hojas e inflorescencias); <i>P. bogotense</i> (hojas); <i>P. arboreum</i> (madera). ....	27
<b>Figura 2-3:</b> Curvas de viabilidad celular para la línea celular A549 frente a los extractos etanólicos de: <i>P. eriopodon</i> (hojas, inflorescencias y madera); <i>P. asperiusculum</i> (hojas); <i>P. pesaresanum</i> (hojas); <i>P. cumanense</i> (hojas e inflorescencias); <i>P. aduncum</i> (inflorescencias); <i>P. bogotense</i> (hojas); <i>P. arboreum</i> (madera). ....	28
<b>Figura 2-4:</b> Extractos etanólicos de especies del género <i>Piper</i> , que presentaron actividad citotóxica frente a las líneas celulares evaluadas con valores de IC <sub>50</sub> menores a 100 µg/mL. Las barras marcadas con letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05). ....	31
<b>Figura 3-1:</b> Correlaciones COSY (negrilla) y HMBC (→) para los compuestos 2 a 5. ....	40
<b>Figura 3-2:</b> Correlaciones COSY (negrilla) y HMBC (→) para los compuestos 6 a 9. ....	43
<b>Figura 3-3:</b> Compuestos derivados de alquenilfenol, aislados del extracto etanólico de las hojas de <i>P. eriopodon</i> . ....	49
<b>Figura 3-4:</b> Efecto citotóxico de los compuestos aislados de las hojas de <i>P. eriopodon</i> en líneas celulares de cáncer humano U373 y MCF7. Las líneas celulares fueron tratadas por 24 h con diferentes concentraciones (100, 30, 10, 1.0 y 0.1 µg/mL) de los compuestos gibbilimbol B, erioquinol y eriopodoles A-G, antes de realizar el ensayo del MTT. ....	50
<b>Figura 3-5:</b> Comparación estructural de algunos alquenilfenoles y alquilquinoas con actividad citotóxica (embelina, climacostol, erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B) y sin actividad citotóxica (sarmentosumoles A y B) en líneas celulares de cáncer. ....	52
<b>Figura 4-1:</b> Efecto citotóxico de los compuestos gibbilimbol B, eriopodol A y erioquinol en líneas celulares humanas de cáncer y en células no transformadas. <b>(A)</b> Células PC-3 y A549 y <b>(B)</b> células HUVEC y MCF10 tratadas con concentraciones crecientes de gibbilimbol B, eriopodol A y erioquinol por 24 h, antes de realizar el ensayo del MTT. ....	65

**Figura 4-2:** Viabilidad celular a diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) de exposición de los compuestos gibbilibol B, eriopodol A y erioquinol a diferentes concentraciones (100, 30, 10, 1.0 y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre la línea celular MCF7, antes de realizar el ensayo del MTT.....66

**Figura 4-3:** Muerte celular inducida por los compuestos aislados de *P. eriopodon* en células MCF7. **(A)** Ensayo TUNEL sobre células MCF7 tratadas por 12 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La tinción de los núcleos se realizó con DAPI y la barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Células MCF7 vistas al microscopio de campo claro, tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B, eriopodol A o erioquinol en concentraciones crecientes. La barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **(C)** Tinción con DAPI de células MCF7 tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . **(D)** Citometría de flujo de células MCF7 en ausencia (CTRL) o en presencia de erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 3 y 6 h y sometidas a tinción con Anexina V/PI. Los eventos indicados en el cuadrante inferior izquierdo corresponden a las células sin marcar y en cada uno de los cuadrantes se indica la proporción relativa de células marcadas. Las imágenes y los datos presentados son representativos de cuatro experimentos independientes.....67

**Figura 4-4:** Activación de caspasas 9 y 7 por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. Análisis por western blot de caspasas 9 y 7 clivadas, en células MCF7 tratadas a diferentes tiempos en ausencia (CTRL) y presencia de **(A)** gibbilibol B o **(B)** eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) utilizando vinculina como control. Las densitometrias fueron realizadas sobre el control vinculina. Las imágenes son representativas de tres a cinco experimentos independientes.  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$  y  $***p < 0.0001$  relativo al control. **(C)** Análisis por western blot de caspasas 9 y 7 clivadas, en células MCF7 tratadas a diferentes tiempos en ausencia (CTRL) o presencia de erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El gel de corrida se utilizó como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. PC: control positivo. **(D)** Inmunofluorescencias de caspasa 7 clivada (rojo) en células MCF7 tratadas en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los núcleos (azul) fueron teñidos con DAPI y el citoesqueleto (verde) con faloidina. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 25  $\mu\text{m}$ . .....69

**Figura 4-5:** Muerte celular y disfunción mitocondrial inducida en células U373 por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Imágenes de inmunofluorescencia confocal de caspasa 7 clivada (rojo) en células U373 tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los núcleos (azul) fueron teñidos con DAPI y el citoesqueleto (verde) con faloidina. La barra de escala corresponde a 25  $\mu\text{m}$ . **(B)** Células U373 vistas al microscopio de campo claro (panel superior) y sometidas a tinción con DAPI (panel inferior), tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$  (panel superior) y 10  $\mu\text{m}$  (panel inferior). **(C)** Análisis cuantitativo de la fluorescencia del ester metílico de tetrametilrodamina (TMRM) en función del tiempo, en células MCF7 (izquierda) y U373 (derecha) en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los resultados son expresados ajustando

la fluorescencia del TMRM con las respectivas muestras control (tratadas con el vehículo), establecidas como 1 en ausencia de compuestos.  $***p < 0.0001$  relativo al control. Las imágenes y los datos son representativos de cuatro experimentos independientes..... 71

**Figura 4-6:** Microscopía confocal para determinar la colocalización de citocromo c con las mitocondrias. Las células **(A)** MCF7 y **(B)** U373 fueron tratadas por 3 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células fueron marcadas para citocromo c (verde), mitocondrias (rojo, COX IV) y los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$  (MCF7) y 25  $\mu\text{m}$  (U373)..... 73

**Figura 4-7:** Microscopía confocal para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células **(A)** MCF7 y **(B)** U373 fueron tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente se realizó el marcaje de ROS con DCFH-DA (verde), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto con faloidina (rojo). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 25  $\mu\text{m}$ . ..... 74

**Figura 4-8:** Muerte celular dependiente e independiente de caspasas, inducida por los compuestos aislados de *P. eriodon*. **(A)** Las células MCF7 fueron tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), junto con el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-(OMe)-FMK (50  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo, antes de realizar el ensayo del MTT. Los resultados son expresados ajustando la absorbancia del MTT con las respectivas muestras control, establecidas como el 100 %. Los datos son representativos de cuatro a doce experimentos independientes.  $***p < 0.0001$  relativa al tratamiento del respectivo compuesto con el vehículo. **(B)** Las células MCF7 (izquierda) y U373 (derecha) fueron tratadas con concentraciones crecientes (0, 0.1, 1.0, 10, 30, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de erioquinol por 24 h antes del ensayo del MTT. Los tratamientos fueron realizados en ausencia (vehículo) o en presencia de los inhibidores de necroptosis (necrostatina-1 a 50  $\mu\text{M}$ ) y ferroptosis (ferrostatina-1 a 10  $\mu\text{M}$ ) con 2 h de pretratamiento. Los resultados son expresados ajustando la absorbancia del MTT con las respectivas muestras control, establecidas como el 100 %. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes..... 76

**Figura 4-9:** Modos de unión obtenidos por acoplamiento molecular de los compuestos embelina (naranja;  $\Delta G_{\text{unión}} = -5.61$  kcal/mol), erioquinol (verde;  $\Delta G_{\text{unión}} = -5.25$  kcal/mol), eriodol A (púrpura;  $\Delta G_{\text{unión}} = -6.10$  kcal/mol) y gibbilibol B (azul;  $\Delta G_{\text{unión}} = -5.14$  kcal/mol) en complejos con el dominio BIR3 de XIAP (pdb 5C83). Los residuos del dominio BIR3 que interaccionan con los ligandos se muestran en líneas gruesas y los puentes de hidrógeno se muestran en líneas punteadas amarillas..... 78

**Figura 4-10:** Dinámicas moleculares de los compuestos aislados de *P. eriodon* con el dominio BIR3 de la proteína XIAP. **(A)** Variación del RMSD del ligando (rojo) y el dominio BIR3 de la proteína XIAP (azul) durante la simulación de la dinámica molecular (50 ns). **(B)** Modos de unión más estables obtenidos de las dinámicas moleculares para los compuestos embelina (naranja), erioquinol (verde), eriodol A (púrpura) y gibbilibol B (azul) en complejos con el dominio BIR3 de XIAP (pdb 5C83). Los residuos del dominio que interaccionan con los ligandos se muestran en líneas gruesas, los puentes de hidrógeno se muestran en líneas

punteadas amarillas y las interacciones de tipo apilamiento  $\pi$ - $\pi$  se muestran en líneas punteadas azules.....80

**Figura 4-11:** Proteína XIAP como blanco molecular de los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Análisis de western blot para XIAP en células MCF7 sin transfectar (CTRL) o transfectadas por 24 h con un siRNA control (scr siRNA) o específico para XIAP (50nM), utilizando LDH como control. La densitometría fue realizada sobre el siRNA control (scr siRNA). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.  $**p < 0.001$  relativo al siRNA control (scr siRNA). **(B)** Las células MCF7 fueron transfectadas por 24 h con un siRNA control o específico para XIAP y posteriormente fueron tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibilimbol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), antes de realizar el ensayo del MTT. Los resultados son expresados ajustando la absorbancia del MTT con el control (scr siRNA), establecida como el 100 %. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.  $*p < 0.0001$  relativo al respectivo siRNA control (scr siRNA). **(C)** Análisis por western blot de caspasa 7 clivada en células MCF7 transfectadas por 24 h con un siRNA control (scr siRNA) o específico para XIAP (50nM) y posteriormente tratadas por 6 h en presencia de gibilimbol B y eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), utilizando LDH como control. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **(D)** PCR en tiempo real y **(E)** análisis por western blot de la expresión de mRNA y los niveles protéicos de XIAP, en células MCF7 tratadas a diferentes tiempos (1, 3 y 6 h) en ausencia (CTRL) o presencia de gibilimbol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), utilizando como controles  $\beta$ -actina (PCR) y LDH (western blot). Los resultados de PCR son expresados de acuerdo al cambio relativo sobre el respectivo control, establecido como 1. Las imágenes y los datos son representativos de tres experimentos independientes. ....82

**Figura 4-12:** Esquema general de los mecanismos de muerte inducidos en células tumorales por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Evasión de apoptosis como una de las principales características del cáncer, promovida por sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, en este caso por la proteína XIAP que se une a la caspasa 9 clivada por medio de su dominio BIR3 e impidiendo que la célula entre en proceso de apoptosis. Los estudios *in silico* realizados en este trabajo, permiten sugerir que los compuestos eriopodol A, gibilimbol B y erioquinol se unen al dominio BIR3 de la proteína XIAP, causando la muerte celular por medio de mecanismos tanto apoptóticos como independientes de caspasas. **(B)** Los compuestos gibilimbol B y eriopodol A producen una respuesta proapoptótica en la célula, induciendo disfunción mitocondrial, liberación de citocromo c y posterior activación de caspasas iniciadoras (caspasa 9) y efectoras (caspasa 7). **(C)** El compuesto erioquinol produce una respuesta similar a nivel mitocondrial, pero sin la activación de caspasas, induciendo una muerte celular independiente de caspasas y caracterizada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citoplasma celular.....84

**Figura IS.3-1:** Espectros IR **(A)** y HRESIMS **(B)** para el compuesto 1. ....100

**Figura IS.3-2:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(A)** y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(B)** para el compuesto 1.....101

**Figura IS.3-3:** Experimentos COSY **(A)** y HMQC **(B)** para el compuesto 1. ....102

**Figura IS.3-4:** Experimento HMBC para el compuesto 1. ....103

**Figura IS.3-5:** Espectros IR **(A)** y HRESIMS **(B)** para el compuesto 2. ....104



<b>Figura IS.3-6:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 2.....	105
<b>Figura IS.3-7:</b> Experimentos COSY <b>(A)</b> y HMQC <b>(B)</b> para el compuesto 2.....	106
<b>Figura IS.3-8:</b> Experimento HMBC para el compuesto 2.....	107
<b>Figura IS.3-9:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 3.....	108
<b>Figura IS.3-10:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 3.....	109
<b>Figura IS.3-11:</b> Experimentos COSY <b>(A)</b> y HMQC <b>(B)</b> para el compuesto 3.....	110
<b>Figura IS.3-12:</b> Experimento HMBC para el compuesto 3.....	111
<b>Figura IS.3-13:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 4.....	112
<b>Figura IS.3-14:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y APT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 4.....	113
<b>Figura IS.3-15:</b> Experimentos COSY <b>(A)</b> y HMQC <b>(B)</b> para el compuesto 4.....	114
<b>Figura IS.3-16:</b> Experimentos HSQC <b>(A)</b> y HMBC <b>(B)</b> para el compuesto 4.....	115
<b>Figura IS.3-17:</b> Experimento J-Resolved para el compuesto 4.....	116
<b>Figura IS.3-18:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 5.....	117
<b>Figura IS.3-19:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, MeOD) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, MeOD) <b>(B)</b> para el compuesto 5.....	118
<b>Figura IS.3-20:</b> Experimentos COSY <b>(A)</b> y HMQC <b>(B)</b> para el compuesto 5.....	119
<b>Figura IS.3-21:</b> Experimento HMBC para el compuesto 5.....	120
<b>Figura IS.3-22:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 6.....	121
<b>Figura IS.3-23:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 6.....	122
<b>Figura IS.3-24:</b> Experimentos COSY <b>(A)</b> y HMQC <b>(B)</b> para el compuesto 6.....	123
<b>Figura IS.3-25:</b> Experimento HMBC para el compuesto 6.....	124
<b>Figura IS.3-26:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 7.....	125
<b>Figura IS.3-27:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 7.....	126
<b>Figura IS.3-28:</b> Experimento APT <b>(A)</b> y COSY <b>(B)</b> para el compuesto 7.....	127
<b>Figura IS.3-29:</b> Experimento HSQC <b>(A)</b> y HMBC <b>(B)</b> para el compuesto 7.....	128
<b>Figura IS.3-30:</b> Experimentos J-Resolved <b>(A)</b> y TOCSY-Selectivo <b>(B)</b> a $\delta_{\text{H}}$ 2.54 en H-1' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN $^1\text{H}$ (rojo) para el compuesto 7.....	129
<b>Figura IS.3-31:</b> TOCSY-Selectivo a $\delta_{\text{H}}$ 3.91 en H-1''' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN $^1\text{H}$ (rojo) para el compuesto 7.....	130
<b>Figura IS.3-32:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 8.....	131
<b>Figura IS.3-33:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 8.....	132
<b>Figura IS.3-34:</b> Experimento APT <b>(A)</b> y COSY <b>(B)</b> para el compuesto 8.....	133
<b>Figura IS.3-35:</b> Experimento HSQC <b>(A)</b> y HMBC <b>(B)</b> para el compuesto 8.....	134
<b>Figura IS.3-36:</b> Experimentos J-Resolved <b>(A)</b> y TOCSY-Selectivo <b>(B)</b> a $\delta_{\text{H}}$ 5.25 en H-4''' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN $^1\text{H}$ (rojo) para el compuesto 8.....	135
<b>Figura IS.3-37:</b> TOCSY-Selectivo a $\delta_{\text{H}}$ 5.42 en H-4' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN $^1\text{H}$ (rojo) para el compuesto 8.....	136

<b>Figura IS.3-38:</b> Espectros IR <b>(A)</b> y HRESIMS <b>(B)</b> para el compuesto 9. ....	137
<b>Figura IS.3-39:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(A)</b> y $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) <b>(B)</b> para el compuesto 9. ....	138
<b>Figura IS.3-40:</b> Experimento DEPT 135 <b>(A)</b> y COSY <b>(B)</b> para el compuesto 9. ....	139
<b>Figura IS.3-41:</b> Experimento HSQC <b>(A)</b> y HMBC <b>(B)</b> para el compuesto 9. ....	140
<b>Figura IS.3-42:</b> Experimentos J-Resolved <b>(A)</b> y TOCSY-Selectivo <b>(B)</b> a $\delta_{\text{H}}$ 5.77 en H-2' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN $^1\text{H}$ (rojo) para el compuesto 9. ....	141
<b>Figura IS.3-43:</b> TOCSY-Selectivo a $\delta_{\text{H}}$ 5.65 en H-5''' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN $^1\text{H}$ (rojo) para el compuesto 9. ....	142
<b>Figura IS.4-44:</b> <b>(A)</b> Análisis por western blot de caspasa 7 clivada en células MCF10 y MCF7 tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gibbilimbol B/eriopodol A o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de erioquinol. El gel de carga fue utilizado como control. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. <b>(B)</b> Análisis por western blot de XIAP y caspasa 7 clivada en células MCF7 transfectadas con un siRNA control o específico para XIAP durante 24 h a concentración de 100 nM, utilizando vinculina como control. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. ....	142
<b>Figura IS.4-45:</b> Proporción de las interacciones del ligando con la proteína, durante la dinámica molecular de 50 ns entre la proteína XIAP y los compuestos <b>(A)</b> embelina, <b>(B)</b> erioquinol, <b>(C)</b> eriopodol A y <b>(D)</b> gibbilimbol B. ....	143

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1.</b> Plantas y extractos de las partes de las plantas utilizadas para realizar el ensayo de citotoxicidad frente a las líneas celulares: A549, PC-3 y MDA-MB-231.....	29
<b>Tabla 3-1:</b> Desplazamientos de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) para los compuestos 1 a 4 ( $\text{CDCl}_3$ ) y 5 (MeOD).....	41
<b>Tabla 3-2:</b> Desplazamientos de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz) para los compuestos 1 a 4 ( $\text{CDCl}_3$ ) y 5 (MeOD).....	42
<b>Tabla 3-3:</b> Desplazamientos de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) para los compuestos 6 a 9 ( $\text{CDCl}_3$ ).....	44
<b>Tabla 3-4:</b> Desplazamientos de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz) para los compuestos 6 a 9 ( $\text{CDCl}_3$ ).....	46
<b>Tabla 3-5:</b> Potencial citotóxico de los compuestos gibbilimbol B, erioquinol y eriopodoles A-G frente a líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama). .....	51

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
AcOEt	Acetato de etilo
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	Apoptosis protease-activating factor-1
APT	Attached proton test
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BIR	Baculovirus IAP Repeat
brd	Doblete ancho
brs	Singlete ancho
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
c-IAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein-2
COSY	Correlation spectroscopy
COX IV	Cytochrome c oxidase (complex IV)
d	Doblete
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dd	Doble doblete
DCM	Diclorometano
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Electrospray ionization
FBS	Suero fetal bovino
FADD	Fas-associated death domain protein
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear correlation through multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HRESIMS	High resolution electrospray ionization mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Herz
ILP2	IAP-like protein 2
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

---

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
m	Multiplete
mRNA	RNA mensajero
MTT	Metil tiazol tetrazolium
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
PBS	Buffer fosfato salino
PI	Propidium Iodide
q	Cuadruplete
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
RING	Really Interesting New Gene
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s	Singlete
siRNA	small interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
spp	Especies
t	Triplete
TMRM	Tetramethylrhodamine methyl ester
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV	Ultravioleta
VDAs	Agentes disruptores vasculares
WHO	World Health Organization
XIAP	X-linked Inhibitor of apoptosis protein
$\delta$	Desplazamiento (ppm)



## Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2012 se reportaron 14,1 millones de casos nuevos de cáncer junto con 8,2 millones de muertes y se estima que para el año 2030 habrá 26,4 millones de personas con esta enfermedad. Actualmente los tratamientos médicos empleados contra el cáncer son la quimioterapia, la cirugía y la radiación, sin embargo, muchos de los fármacos utilizados han mostrado ser poco selectivos y con altos niveles de resistencia y toxicidad, disminuyendo considerablemente la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad. La resistencia a la quimioterapia ha sido asociada con algunos factores entre los que se encuentran la diversidad molecular de los diferentes tipos de cáncer que pueden generar multirresistencia y en algunos casos a la sobreexpresión de algunas proteínas, como por ejemplo las proteínas IAP (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis), las cuales evitan que la célula entre en un proceso apoptótico o de muerte celular programada y contribuyen a la progresión del tumor.

En los últimos años, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer se ha enfocado principalmente en afectar directamente los mecanismos específicos de muerte celular a nivel molecular, bien sea sobre receptores de muerte que se encuentran a nivel de membrana celular o sobre proteínas citoplasmáticas, que permitan tratar de inducir toda la maquinaria interna de la célula hacia un proceso apoptótico. Un claro ejemplo, está representado por la búsqueda de antagonistas de las proteínas IAP, especialmente de la proteína XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) que impide que las células cancerígenas entren en un proceso de muerte celular programada por inhibición directa de la acción de las caspasas efectoras. Algunos antagonistas naturales de la proteína XIAP como la embelina y ciertos alquilfenoles, se caracterizan por ser moléculas simples que han mostrado tener alta selectividad e inducción a apoptosis en células tumorales. Sin embargo, las investigaciones son escasas y es necesario ampliar el conocimiento en estos compuestos como base estructural para el descubrimiento de nuevos fármacos y principios activos en el tratamiento del cáncer. Este tipo de metabolitos son abundantes en la familia Piperaceae y especialmente en el género

*Piper*, que se encuentra ampliamente distribuido en Colombia en los bosques tropicales del país. El género *Piper* recientemente ha sido considerado por algunos autores como una fuente potencial de nuevos compuestos con actividad antitumoral, debido al gran uso de algunas especies de este género en la medicina tradicional contra el cáncer. Dada la amplia distribución del género *Piper* en nuestro país y a la necesidad de buscar nuevos compuestos con actividad antitumoral, en este trabajo se evaluó el potencial citotóxico de distintas especies vegetales del género *Piper* frente a diferentes líneas celulares de cáncer humano, con el fin de realizar el estudio fitoquímico de la especie vegetal con mayor efecto citotóxico y poder aislar e identificar los compuestos responsables de dicha actividad.

Esta tesis fue organizada en cuatro capítulos secuenciales. En el primer capítulo se presenta una revisión bibliográfica general sobre el aporte de los productos naturales en la investigación contra el cáncer y la importancia del género *Piper* como fuente de compuestos con potencial citotóxico. En los capítulos 2 y 3, se presenta el screening de actividad citotóxica realizado con diferentes especies del género *Piper* y el aislamiento y caracterización química de algunos metabolitos de la especie *P. eriopodon* que mostró tener el efecto citotóxico más potente, así como la determinación de la actividad citotóxica en células tumorales para todos los compuestos aislados. Finalmente, en el capítulo 4 se presentan los resultados de la búsqueda de los mecanismos de muerte celular inducidos por los tres compuestos más activos en líneas celulares de cáncer humano, junto con algunos estudios *in silico* y moleculares, que se realizaron con el fin de evaluar el potencial efecto antagonista de los compuestos aislados de *P. eriopodon* sobre la proteína antiapoptótica XIAP, a través de la interacción de los compuestos con su dominio BIR3.



# 1. Capítulo 1: Estado del arte

## 1.1 Introducción

A pesar de que en los últimos años los científicos han retomado las investigaciones en los productos naturales como fuente de nuevos medicamentos para el cuidado de la salud y el tratamiento de muchas enfermedades crónicas tales como el Alzheimer, Artritis, Hepatitis, Diabetes, Tuberculosis, SIDA y Cáncer, hoy en día muchos países en desarrollo siguen utilizando la medicina tradicional debido a su bajo costo y el acceso limitado a los tratamientos farmacéuticos. Son precisamente estos conocimientos etnobotánicos aplicados en la medicina tradicional los responsables en muchas ocasiones del descubrimiento de nuevos principios activos frente a distintas enfermedades, tomando de partida las fuentes naturales<sup>1</sup>. Por ejemplo, los compuestos naturales vinblastina, taxol, etopósido e irinotecan entre muchos otros, han traído una nueva luz para el tratamiento de los enfermos de cáncer<sup>2</sup>. Sin embargo, la complejidad química y estructural característica de estos compuestos, hacen difícil y costoso tanto su aislamiento, como la elucidación estructural y generación de nuevas rutas sintéticas que permitan obtener mayores cantidades de estos compuestos. En este primer capítulo se presenta una revisión general sobre algunos de los productos naturales vegetales más representativos utilizados en el tratamiento del cáncer y un acercamiento sobre sus mecanismos de acción, relacionados con algunas de las proteínas de muerte mas relevantes en los procesos de inhibición de apoptosis. También se presenta una descripción general del género *Piper* (Piperaceae), sus metabolitos más representativos y algunos de los compuestos con mayor potencial antitumoral que han sido aislados de las diferentes especies del género.

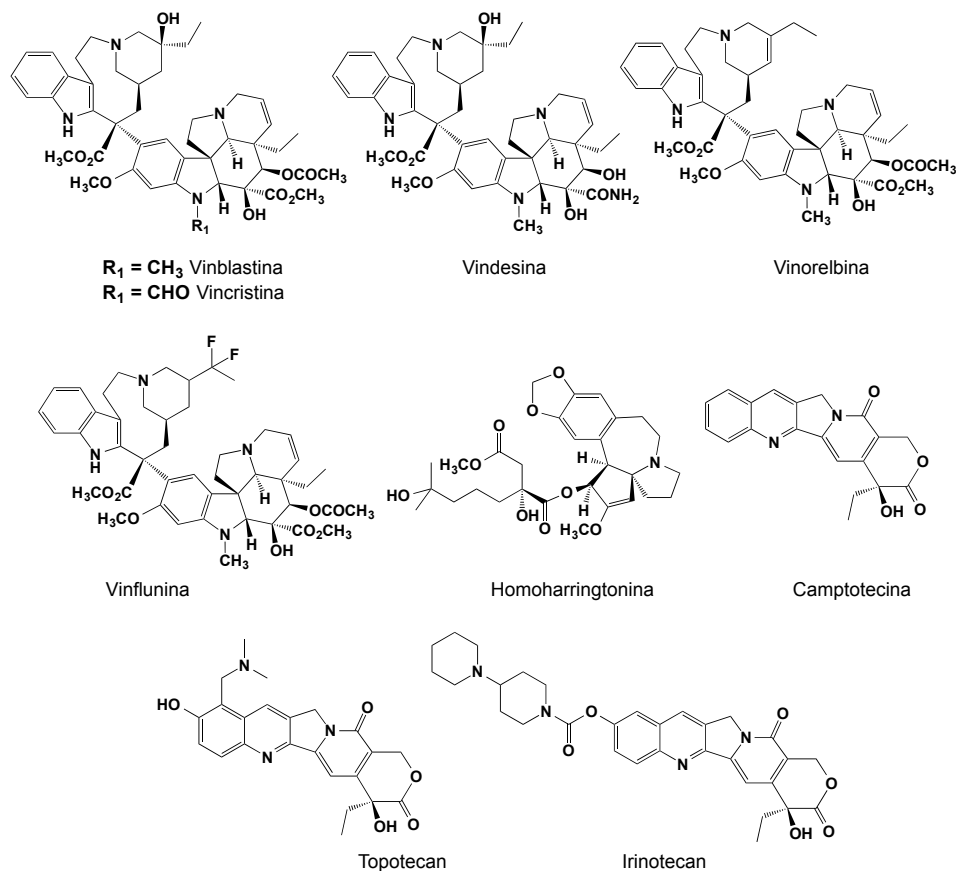
### 1.1.1 Compuestos de origen vegetal utilizados en el tratamiento del cáncer

No podemos considerar como una sorpresa o una coincidencia, el hecho de que la investigación fitoquímica represente un legado histórico importante en el descubrimiento de nuevos

fármacos contra el cáncer. Generalmente, los mecanismos de defensa de las plantas se basan en su capacidad de generar sustancias químicas que posean un efecto citotóxico o citostático y sus características únicas tales como la selección evolutiva de poseer actividad biológica, las convierten en una fuente inestimable de nuevas sustancias con actividad antitumoral. Es así como la lista de medicamentos contra el cáncer que han proporcionado los productos naturales incluye a fármacos de gran éxito como la doxorrubicina, paclitaxel, vinblastina, etopósido, irinotecan, gemcitabina, metotrexato<sup>3</sup> y fitofármacos como el polifenon E, que es una mezcla estandarizada de los polifenoles epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG), galato de epigalocatequina (EGCG) y galato de galocatequina (GCG), preparada de las hojas del árbol de té *Camellia sinensis* (Theaceae)<sup>4</sup>.

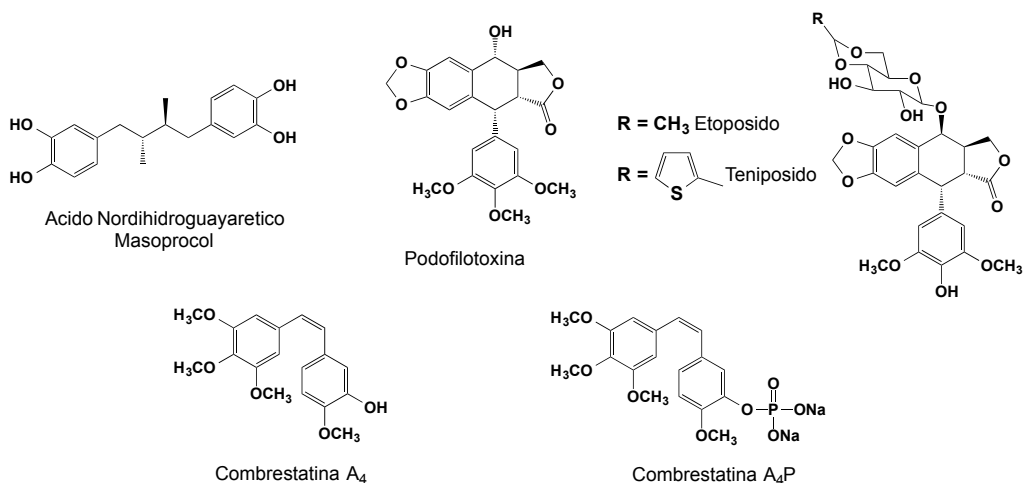
Numerosas investigaciones han reiterado y confirmado la importancia que tienen los productos naturales en la búsqueda de moléculas de interés terapéutico frente al cáncer<sup>5-8</sup>. La primera generación de medicamentos descubiertos se centraba en la obtención de moléculas que actuaran como agentes citotóxicos, bien sea que causaran daños irreparables al DNA, inhibiendo su síntesis o interfiriendo con los mecanismos de división celular, por ejemplo, bloqueando las topoisomerasas o la unión de microtúbulos<sup>8</sup>. Muchos de estos agentes fueron descubiertos realizando ensayos biológicos basados únicamente en compuestos que fueran capaces de afectar la supervivencia celular, especialmente en células de cáncer, encontrando en los productos naturales, una gran variedad de metabolitos como alcaloides, lignanos, flavonoides, estilbenos, toxoides, combrestatinas, acetogeninas y quinonas, con gran potencial citotóxico.

Dentro de los compuestos naturales vegetales más utilizados para el tratamiento de cánceres de mama, testículo, pulmón y leucemia, se encuentran diferentes alcaloides como la vinblastina y vincristina, aislados de la especie vegetal *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) endémica de Madagascar<sup>9</sup>; la camptotecina, aislada de la especie *Camptotheca acuminata* (Cornaceae)<sup>10</sup>; y la homoharringtonina, aislada del árbol de hoja perenne *Cephalotaxus harringtonia* K. Koch var. *Harringtonia* (Cephalotaxaceae) originario de Japón. A partir de estos compuestos se han desarrollado derivados semisintéticos que mejoran su actividad o solubilidad como lo son la vindesina, vinorelbina, vinflunina, topotecan e irinotecan, siendo estos dos últimos comercializados como Hycamtin y Campostar por GlaxoSmithKline y Pfizer, para los tratamientos de cáncer de colon y ovario<sup>5,8</sup>.

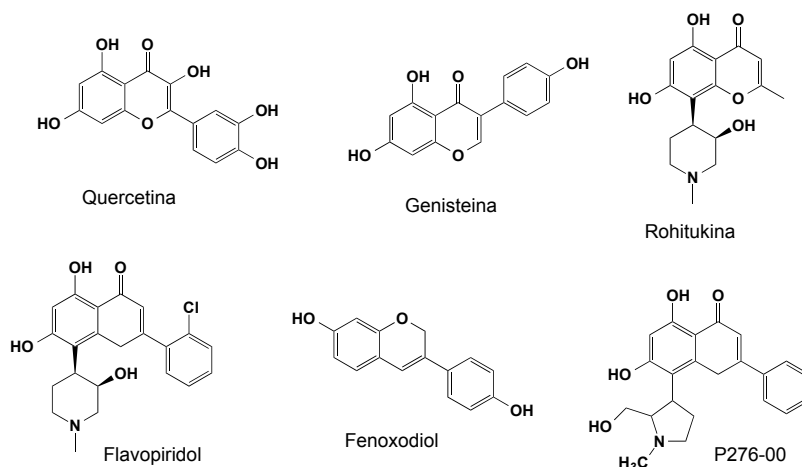


Dentro de los compuestos de tipo lignano, se encuentran el ácido nordihidroguayaretico aislado de la especie *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) y la podofilotoxina aislada de especies vegetales del género *Podophyllum* (Berberidaceae), principalmente *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum notatum*, a partir de la cual se obtuvieron los derivados etopósido y tenipósido, utilizados para el tratamiento de diferentes tipos de linfomas y leucemias<sup>11</sup>. También se han reportado estilbenos como las combrestatinas, aisladas de la especie vegetal *Combretum caffrum* (Combretaceae) donde a partir de la combrestatina A<sub>4</sub> se obtuvo el análogo combrestatina A<sub>4</sub>-fosfato que es soluble en agua y que mostró tener actividad promisorio contra el cáncer de tiroides en los ensayos clínicos preliminares<sup>12</sup>.

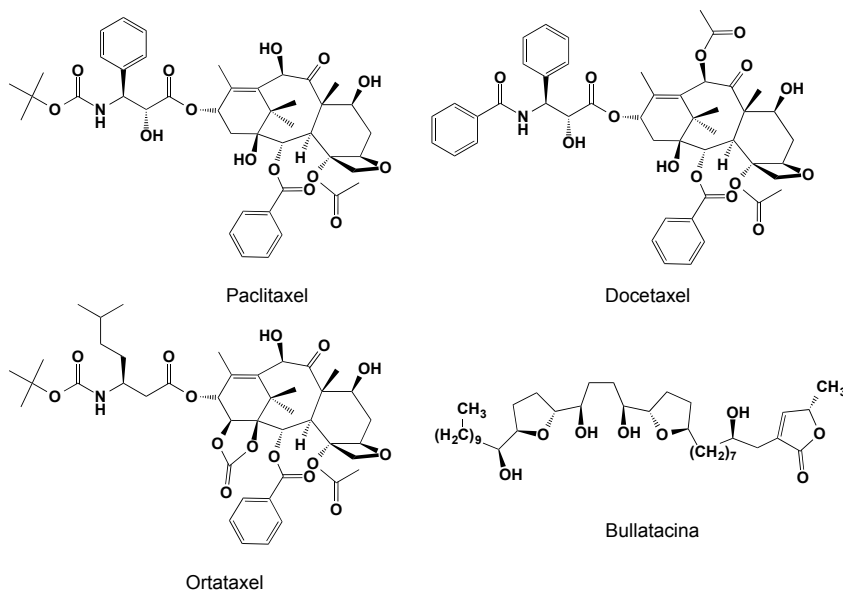
Los compuestos de tipo flavonoide que se encuentran presentes en la mayoría de granos, verduras y frutas, están jugando un papel importante en el descubrimiento de nuevos fármacos menos tóxicos, debido a sus efectos protectores frente a algunos tipos de cáncer; hecho que los ha convertido en agentes potenciales para el tratamiento de esta enfermedad<sup>5</sup>.



Aunque algunos flavonoides han comenzado a ser evaluados en estudios clínicos como agentes preventivos, tal vez los más estudiados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de mama, próstata y vejiga son la quercetina, genisteína y rohitukina<sup>13,14</sup>. Las estructuras químicas de algunos flavonoides han servido de punto de partida para el desarrollo de los agentes terapéuticos flavopiridol, fenoxodiol y el análogo P276-00, que se encuentran en estudios clínicos contra una amplia gama de tumores, incluidos linfomas y leucemias<sup>15</sup>.



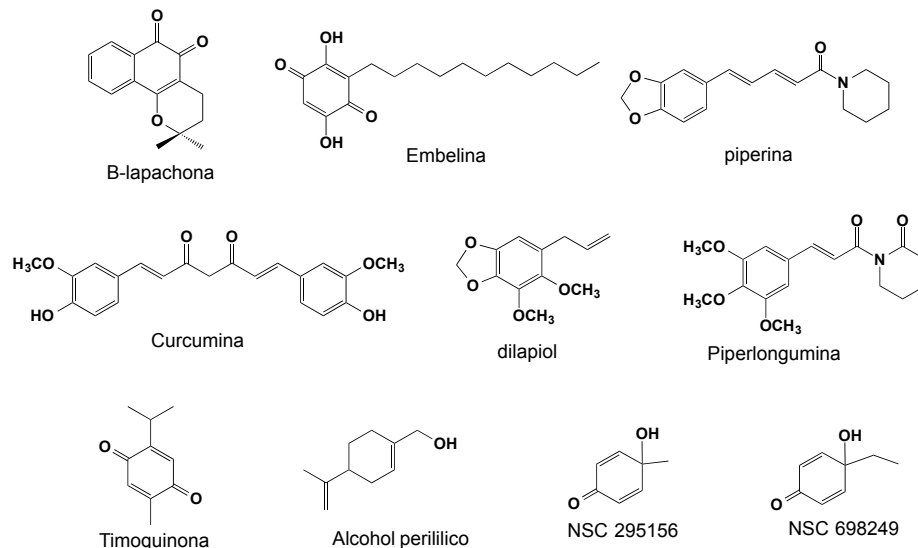
Tal vez los agentes quimioterapéuticos derivados de productos naturales vegetales más conocidos y utilizados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, son los taxanos<sup>16-18</sup>, representados principalmente por el paclitaxel, aislado de especie vegetal *Taxus brevifolia* (Taxaceae) y conocido inicialmente como taxol.



A partir de esta estructura química se partió para la síntesis del docetaxel y ortataxel, que mostraron ser más activos contra cáncer de seno, ovario y pulmón. Aunque se encuentran 23 taxanos diferentes en estudios preclínicos<sup>19,20</sup> y su actividad en el tratamiento del cáncer ha sido de gran ayuda, en la familia Anonáceae se han reportado compuestos de tipo acetogenina como la bullatacina, que mostro ser 300 veces más activa que el taxol cuando se le administró a ratones a los que se les había inducido un tumor con células L-1210 (cáncer de leucemia). Los ratones tratados con taxol perdieron un 10% de su peso, mientras que los tratados con bullatacina aumentaron su peso en un 5%, lo que sugiere potencialmente que es menos tóxica que el taxol. Actualmente se están estudiando más de 150 tipos de acetogeninas en diferentes líneas celulares de cáncer<sup>21,22</sup>.

También se han reportado algunos compuestos de núcleo quinona como la  $\beta$ -lapachona aislada del árbol de lapacho *Tabebuia avellanae* (Bignoniaceae), la embelina de la especie *Embelia ribes* (Myrsinaceae) utilizada ampliamente en la medicina tradicional China, y la timoquinona<sup>23</sup> de la especie *Nigella sativa* (Ranunculaceae), los cuales se encuentran en diferentes fases de estudio clínico<sup>24</sup> para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de colon, ovario, pulmón, próstata y mama. Otros compuestos que son interesantes debido a su simplicidad estructural, gran actividad frente a distintos tipos de cáncer y baja toxicidad, son los análogos sintéticos NSC 295156<sup>25</sup>, NSC 698249<sup>26</sup> y compuestos naturales como la curcumina<sup>27</sup>, el alcohol

perilífico<sup>19</sup>, el dillapiol<sup>28</sup>, la piperina<sup>29</sup> y la piperlongumina<sup>30</sup>, siendo estos tres últimos compuestos aislados de diferentes especies del género *Piper* (Piperaceae).



### 1.1.2 Mecanismos de acción y quimiorresistencia

Los fármacos antineoplásicos derivados de fuentes vegetales se caracterizan en su gran mayoría por ser agentes antimetabólicos, que inducen la muerte de las células cancerosas generalmente cuando se encuentran en el proceso de Mitosis<sup>31</sup>. Esta es la razón principal del porqué afectan también a las células sanas, induciendo daños sobre cualquier célula del cuerpo que se encuentre en proceso de división, generando una serie de efectos secundarios no deseados en la mayoría de los tratamientos con quimioterapia. Por ejemplo, la camptotecina y sus derivados comerciales Topotecan e Irinotecan actúan sobre las topoisomerasas I y II, que son las enzimas encargadas de liberar las tensiones causadas por los enrollamientos del ADN durante su proceso de transcripción, reparación y replicación, haciendo irreversible la regeneración de la cadena de ADN una vez que éste ha sido separado para replicarse o liberar tensión<sup>32,33</sup>.

Los alcaloides de la vinca, las combrestatinas y sus derivados, evitan que sea completada la fase de mitosis celular, inhibiendo la formación de los microtúbulos, que son las estructuras responsables de separar el material cromosómico y distribuirlo equitativamente entre las dos células hijas. Esta inhibición en la formación del huso mitótico es debida a que estos compuestos se unen a la Tubulina, e impiden su polimerización durante la formación de los microtúbulos<sup>34</sup>. Tal vez las combrestatinas hacen parte de los compuestos citotóxicos de los

cuales se tiene mayor conocimiento a nivel de su mecanismo de acción, ya que adicionalmente al efecto antimetabólico a nivel celular, también puede tener un efecto antiangiogénico y antivascular a nivel del tumor<sup>35-37</sup>, inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos y uniéndose a la Tubulina celular endotelial de las células que revisten los vasos sanguíneos de los tumores, las cuales generan cambios morfológicos en las paredes vasculares e impiden el flujo de sangre hacia el tumor, para evitar la llegada de nutrientes y oxígeno, induciendo necrosis a causa de hipoxia e inanición<sup>38-40</sup>. Estos fármacos son conocidos como agentes disruptores vasculares o VDAs<sup>41</sup> por sus siglas en inglés “Vascular Disrupting Agents” y están siendo estudiados por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos para el tratamiento de tumores sólidos de rápida evolución, como el fármaco Crolibulin<sup>42</sup> utilizado en el cáncer anaplásico de tiroides, o por compañías farmacéuticas como Oxigene para el tratamiento de cáncer de ovario y tumores neuroendocrinos gastrointestinales como es el caso del Fosbretabulin<sup>43</sup>.

Los lignanos como la podofilotoxina y sus derivados comerciales Etoposido y Teniposido ejercen su mecanismo de acción no sólo afectando a la Topoisomerasa II sino que también se unen a la tubulina, evitando tanto la formación de microtúbulos como la regeneración del ADN después de su replicación. Los taxanos al igual que la podofilotoxina actúa a nivel de los microtúbulos, pero en lugar de inhibir su formación a partir de la polimerización de la tubulina, tienen una gran capacidad para estabilizar sus estructuras e impedir su desacoplamiento, generando un desbalance en la célula que finalmente terminará en apoptosis<sup>34</sup>.

Otros compuestos como la embelina, la timoquinona y la piperlongumina, pueden actuar como antagonistas de las proteínas IAP<sup>44</sup>, quienes se encargan de controlar a las caspasas, que son las principales proteínas encargadas de ejecutar esta forma de muerte celular programada. Estos compuestos impiden que la proteína XIAP se una a las caspasas, dejando libre las caspasas efectoras de apoptosis como lo son las caspasas 3 y 7, desencadenando en la célula el proceso de muerte celular programada. Por ejemplo, la embelina es efectiva sola o en combinación con otros fármacos sobre células cancerosas que presenten una sobreexpresión de la proteína XIAP, incluso en células PC-3 (cáncer de próstata)<sup>45</sup> y en células H460 (cáncer de pulmón) cuando es administrada en combinación con el cisplatino, medicamento que es ampliamente utilizado en quimioterapias al que las células H460 son resistentes<sup>46</sup>.

Esta quimiorresistencia o resistencia a la quimioterapia ha sido asociada a muchos factores, entre los que se encuentran: (i) la disminución en la captación de algunos fármacos solubles en agua como por ejemplo el cisplatino, análogos de nucleósidos, antagonistas de ácido fólico y (ii) a los diferentes cambios generados en la célula que afectan directamente la capacidad citotóxica de los fármacos, como alteraciones a nivel citoplasmático, cambios en el ciclo celular, aumento en la reparación del ADN y disminución de apoptosis<sup>47</sup>. Dentro de estos cambios a nivel celular que pueden generar multirresistencia, se puede encontrar un aumento o sobreexpresión de algunas proteínas, como las proteínas IAP, las cuales además de evitar que la célula entre en apoptosis, contribuyen también a la progresión del tumor<sup>48</sup>. Las proteínas IAP se encuentran a nivel citoplasmático en la célula, son encargadas de reclutar e inhibir factores proapoptóticos y se pueden considerar como los últimos salvavidas que tiene la célula justo antes de entrar en apoptosis, ya que inhiben la actividad enzimática de las caspasas efectoras llevándolas a su degradación por ubiquitinación<sup>49</sup>. Este fenómeno se traduce finalmente en que la célula no muere y continúa con sus funciones de división celular de forma descontrolada convirtiéndose así en una célula cancerosa.

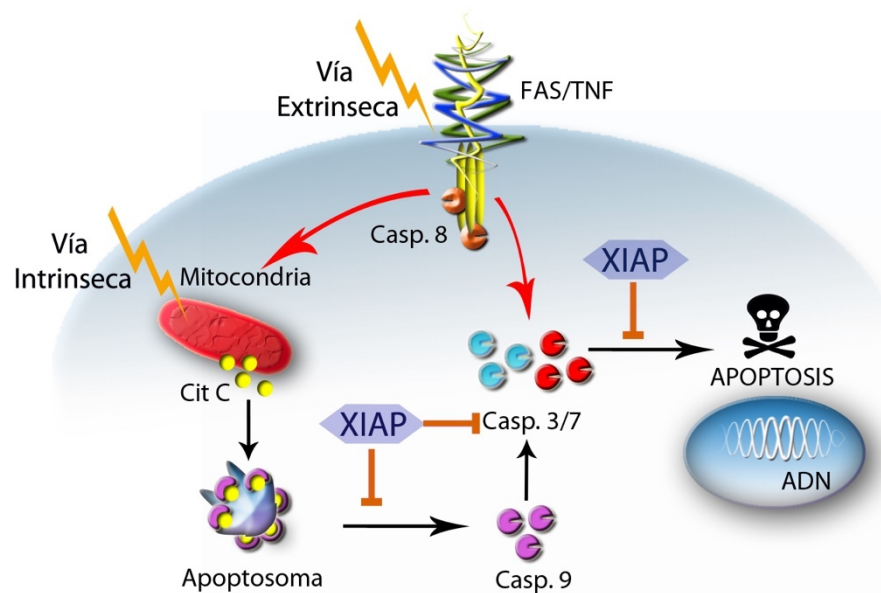
## 1.2 Apoptosis y Proteínas Inhibidoras de Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por varios cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular<sup>50</sup>. Esta forma de muerte celular programada es ejecutada por las caspasas, a través de las cuales la célula realiza de forma autorregulada un proceso interno de destrucción de sus proteínas, citoesqueleto, organelos, membrana nuclear y ADN, agrupando todo el material celular en pequeños cuerpos denominados cuerpos apoptóticos, que posteriormente son eliminados por fagocitosis, sin generar un proceso inflamatorio<sup>51</sup>. Este proceso de muerte celular programada puede activarse de forma general a través de dos vías: Una vía Intrínseca y una Extrínseca, que dependen directamente del origen del estímulo de muerte<sup>52</sup> (Figura 1-1).

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN. Esta vía es mediada desde la mitocondria, que libera diversas proteínas proapoptóticas hacia el citoplasma celular en respuesta a los estímulos apoptóticos. Algunas de estas proteínas son: el Citocromo C, Smac/Diablo, AIF, EndoG, proteínas de la familia BCL-2 como BCL-2 y BCL-XL<sup>53</sup>.



La más importante de estas proteínas proapoptóticas es el Citocromo C, el cual se une y activa a la proteína APAF-1 en el citoplasma, lo que promueve la formación del apoptosoma, que media la activación autocatalítica de caspasa 9 que a su vez activa a las caspasas efectoras 3 y 7 (Figura 1-1). La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores de muerte como Fas o TNF, a través de la unión de un ligando de muerte asociado a su respectivo receptor en la superficie celular. Esta unión, conduce a la formación de un complejo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y Caspasa 8, para activar posteriormente a las caspasas efectoras 3 y 7<sup>53</sup> (Figura 1-1).

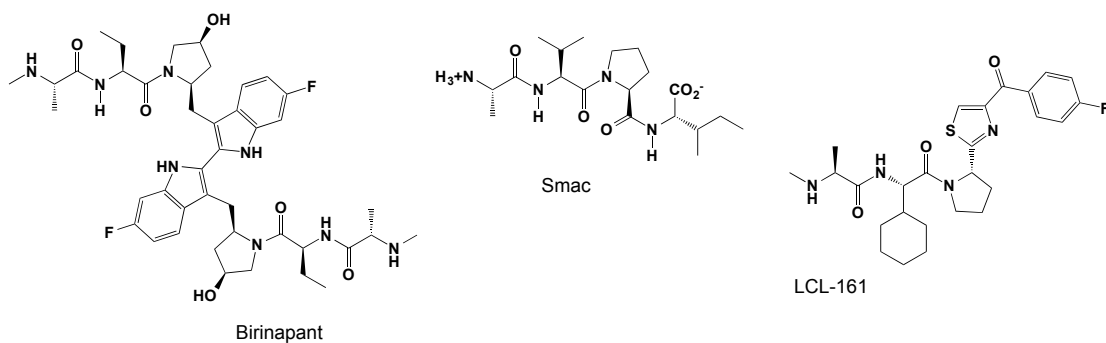


**Figura 1-1:** Vías intrínseca y extrínseca de activación de Apoptosis. La vía intrínseca se activa por un estímulo interno a través de la mitocondria. La vía extrínseca se activa por un estímulo externo a través de los receptores de muerte como FAS/TNF.

Sin embargo, estos procesos tanto intrínsecos como extrínsecos de activación de caspasas que finalizan en apoptosis, se ven interrumpidos o afectados cuando en el citoplasma celular están presentes las proteínas IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins), que son proteínas que se caracterizan por poseer de uno a tres dominios BIR (Baculovirus IAP Repeat) capaces de inhibir la activación enzimática de las caspasas. Aunque se conocen ocho proteínas diferentes inhibitoras de apoptosis (*NAIP*, *ciAP1*, *ciAP2*, *XIAP*, *ILP2*, *livin*, *survivin* y *BRUCE*)<sup>54</sup>, las caspasas 3, 7 y 9 son objeto de inhibición principalmente por XIAP y en menor proporción por c-IAP1, c-IAP2 y NAIP<sup>55,56</sup>. De estas proteínas, XIAP ha sido la más estudiada, se compone de tres

dominios BIR (BIR1, BIR2 y BIR3) y un dominio RING capaz de unirse a enzimas de ubiquitinación. El papel crucial que juega XIAP en el mecanismo de regulación de la apoptosis, se da principalmente a través de sus dominios BIR2 y BIR3, donde BIR3 inhibe la caspasa 9 y evita la formación del apoptosoma, mientras que la región de unión entre sus dominios BIR1 y BIR2 inhibe las caspasas efectoras 3 y 7 evitando que la célula pueda entrar en un proceso de apoptosis<sup>57</sup>.

Por otro lado, para que en una célula ocurra el proceso contrario, es decir, que pueda entrar en proceso de muerte celular programada, XIAP debe mantenerse controlada y esta función es realizada por la proteína proapoptótica Smac/Diablo que es liberada por la mitocondria. Smac/Diablo actúa como un antagonista endógeno de XIAP, ya que se une a sus dominios BIR para generar cambios conformacionales que activan la degradación por ubiquitinación de XIAP y evitar así la interacción entre XIAP y las caspasas. Se ha determinado que Smac/Diablo se une fuertemente al dominio BIR3 de XIAP a través del tetrapéptido AVPI<sup>58</sup> del extremo amino terminal de Smac/Diablo, dejando libres las caspasas activas 3, 7 y 9 para que la célula pueda entrar en proceso de apoptosis<sup>59,60</sup>. Este tetrapéptido ha servido de punto de partida para realizar la síntesis de otros péptidos similares<sup>61-63</sup> con el fin de que actúen como inhibidores de las IAP y promuevan la inducción de muerte celular frente a diferentes líneas celulares tumorales<sup>64,65</sup>, como es el caso de los análogos sintéticos Birinapant y LCL-161 que se encuentran en ensayos clínicos contra diferentes tipos de tumores sólidos<sup>66</sup>.



### 1.3 Generalidades del género *Piper*

El género *Piper* es el más importante de la familia Piperaceae y su especie más representativa es *Piper nigrum*, a partir de la cual se obtienen los frutos ampliamente conocidos en el mundo gastronómico como pimienta negra. Otra especie representativa de este género es *Piper*

*methysticum*, conocida como (kawa-kawa) y utilizada desde tiempos ancestrales por los indígenas de Oceanía, quienes tomaban preparados acuosos de las raíces para amenizar sus reuniones sociales, tradición que aún se utiliza en algunas islas de Polinesia donde es tomada por los nativos durante ceremonias religiosas<sup>67</sup>.

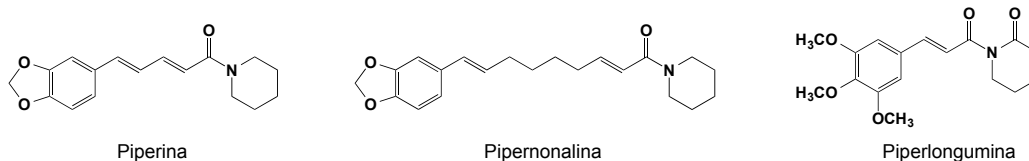
La gran mayoría de especies del género *Piper*, reside en la zona tropical de América (700 spp), seguida del sur de Asia y Oceanía (300 spp); donde las especies económicamente más importantes son *P. nigrum* L. (pimienta negra) y *P. bettle* L<sup>68</sup>. En Colombia, el género *Piper* es conocido como “cordoncillo” debido a la forma de sus inflorescencias y se encuentra ampliamente distribuido en bosques tropicales y húmedos, especialmente en regiones del Chocó, Antioquia, Cundinamarca y Santander.

Existen muchos reportes referentes a estudios fitoquímicos de especies pertenecientes al género *Piper* en donde podemos encontrar gran variedad de compuestos como amidas, flavonoides, kavapironas, lignanos, neolignanos, piperóidos, propenilfenoles y terpenos<sup>69,70</sup>. Recientemente, el género *Piper* ha sido considerado por algunos autores como una fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral, debido al uso de algunas especies de este género en la medicina tradicional contra el cáncer<sup>71-74</sup>. Dentro de estos reportes etnobotánicos se encuentran especies como *P. aduncum*, *P. boehmeriifolium* Wall, *P. capense* L.f., *P. cubeba* L., *P. gibbilimum* C.D.C., *P. guineense*, *P. longum* L., *P. nigrum* L., *P. sylvaticum* Roxb, *P. barbatum*, *P. sanvicentense* y *P. guineense*, que han sido utilizadas en la medicina tradicional para tratar diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentran cánceres de mama, útero, gástrico y piel entre otros<sup>74,75</sup>.

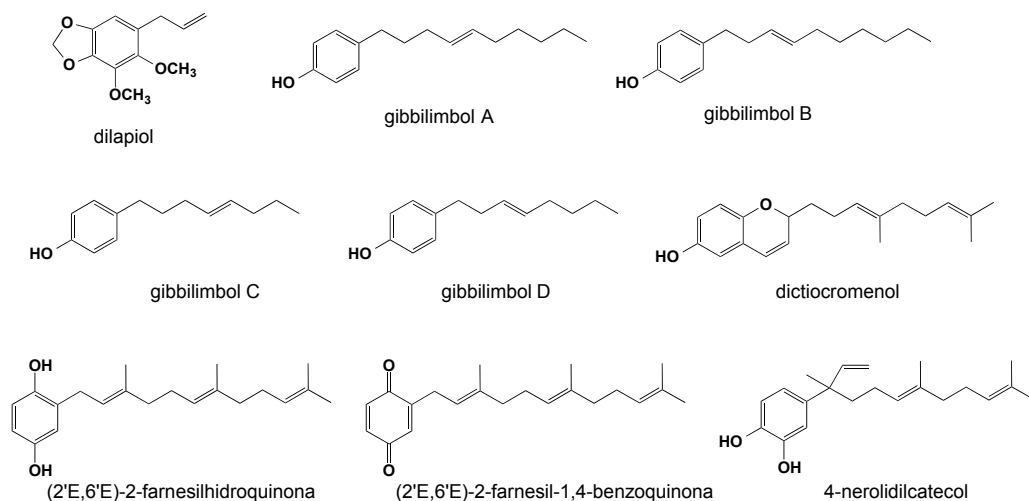
Los estudios fitoquímicos de este género con mayor número de reportes de actividad citotóxica, incluyen una variedad de metabolitos secundarios, dentro de los que se encuentran compuestos del tipo fenilpropano, amida, alquilfenoles y flavonas. Las amidas del género *Piper*, han sido los compuestos que han presentado mayor actividad promisoriosa frente a la inhibición del crecimiento de diferentes tipos de tumores, evitando la proliferación celular y generando inducción de apoptosis en las células de cáncer, especialmente las que presentan multirresistencia<sup>76</sup>. Por ejemplo la piperina que es el compuesto responsable del sabor picante de la pimienta y que es obtenida de los frutos de la especie *P. nigrum*, es capaz de potencializar el efecto citotóxico de fármacos como la Mitoxantrona y Doxorrubicina, sobre las líneas

celulares MCF7 (cáncer de mama) y A-549 (cáncer de pulmón) que se han vuelto resistentes a este tipo de tratamientos<sup>77</sup>.

La piperlongalina, aislada de los frutos de diferentes especies del género *Piper*, inhibe el crecimiento de células de cáncer de próstata PC-3 y adicionalmente promueven un proceso proapoptótico en dichas células, incrementando el nivel de especies reactivas de oxígeno a nivel citoplasmático<sup>76</sup>, activando posteriormente la caspasa 3 para desencadenar apoptosis.



La piperlongumina, aislada de la especie vegetal *Piper longum* y que es utilizada ampliamente en la medicina Ayurvedica India, exhibe el más amplio y promisorio espectro de citotoxicidad contra una gran variedad de células de cáncer en ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*. La piperlongumina, ha demostrado su gran potencial como agente antitumoral frente a 13 líneas celulares diferentes que incluyen cáncer de colon, mama, páncreas, óseo, piel y pulmón, sin causar toxicidad en las células sanas<sup>78</sup>. Adicionalmente, en ensayos realizados *in vivo*, la piperlongumina logró disminuir de forma considerable el tamaño de los tumores inducidos en ratones con líneas celulares de cáncer MDA-MB-436 (mama), A549 (pulmón) y EJ (vejiga), inclusive en algunos casos de forma más efectiva que en los tumores tratados con paclitaxel o cisplatino.



Otros compuestos como el dilapiol, que es el principal componente del aceite esencial de la especie *P. aduncum*, posee actividad citotóxica frente a células MDA-MB-231 (cáncer de mama) y SK-MEL-28 (melanoma), ya que induce apoptosis por la vía intrínseca a través de la mitocondria, causando la liberación de Citocromo c y posteriormente la activación de caspasa 3<sup>28</sup>. Se han reportado también una gran variedad de compuestos de tipo alquenilfenol, dentro de los que se encuentran los gibbilimboles A-D aislados de *P. gibbilimum* que presentan actividad citotóxica frente a células KB (carcinoma de nasofaringe)<sup>79</sup> y el 4-nerodilcatecol aislado de *P. umbellata* L. que ha mostrado ser inductor de apoptosis frente a células K562 (leucemia)<sup>80</sup> y SK-Mel-28 (melanoma)<sup>81</sup>.

En las especies *P. bogotense* y *P. barbatum* se han reportado compuestos de tipo quinona e hidroquinona como la (2'E,6'E)-2-farnesil-1,4-benzoquinona y la (2'E,6'E)-2-farnesilhidroquinona, así como el cromeno dictiocromenol, estos tres compuestos fueron evaluados contra tres líneas celulares diferentes, siendo la quinona el compuesto más activo frente a la línea celular MCF7 (cáncer de mama), el cromeno frente a la línea celular H-460 (cáncer de pulmón) y la hidroquinona sobre la línea celular SF-268 (cáncer de glioblastoma) que corresponde a uno de los cánceres más agresivos y difíciles de tratar<sup>72,82</sup>.

En general, el género *Piper* constituye una fuente valiosa de diferentes compuestos con potencial citotóxico y sus especies vegetales deben ser consideradas en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antitumoral. Por esta razón y teniendo en cuenta que el género se encuentra ampliamente distribuido las diferentes regiones de nuestro país, en el siguiente capítulo se presentará un screening de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano, utilizando extractos etanólicos obtenidos de diferentes especies Colombianas del género *Piper*; y en los capítulos posteriores, se presentará el estudio fitoquímico de la especie más activa, con el fin de encontrar los principales metabolitos responsables de la actividad citotóxica y evaluar su potencial farmacológico en células tumorales.

## 1.4 Bibliografía

- (1) Fridlender, M.; Kapulnik, Y.; Koltai, H. Plant Derived Substances with Anti-Cancer Activity: From Folklore to Practice. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6* (799), 1–9.
- (2) Lee, K. Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic

- Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (919), 500–516.
- (3) Dobbstein, M.; Moll, U. Targeting Tumour-Supportive Cellular Machineries in Anticancer Drug Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (3), 179–196.
- (4) Fu, H.; He, J.; Mei, F.; Zhang, Q.; Hara, Y.; Ryota, S.; Lubet, R. a.; Chen, R.; Chen, D. R.; You, M. Lung Cancer Inhibitory Effect of Epigallocatechin-3-Gallate Is Dependent on Its Presence in a Complex Mixture (Polyphenon E). *Cancer Prev. Res.* **2009**, *2* (6), 531–537.
- (5) Neidle, S.; Arimondo, P. B.; Guilbaud, N.; Bailly, C. *Cancer Drug Design and Discovery*, Second edi.; Neidle, S., Ed.; Elsevier, 2014.
- (6) Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (6), 3670–3695.
- (7) Appendino, G.; Fontana, G.; Pollastro, F. Natural Products Drug Discovery. *Compr. Nat. Prod. II* **2010**, 205–236.
- (8) Neidle, S.; HURYN, D. M.; WIPF, P. *Natural Product Chemistry and Anticancer Drug Discovery*; Elsevier, 2008.
- (9) Rabbani-Chadegani, A.; Chamani, E.; Hajihassan, Z. The Effect of Vinca Alkaloid Anticancer Drug, Vinorelbine, on Chromatin and Histone Proteins in Solution. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *613* (1–3), 34–38.
- (10) Hitt, E. Homoharringtonine Effective in CML Patients. *Lancet Oncol.* **2002**, *3* (5), 259.
- (11) Cragg, G. M.; Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J.; Newman, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (7), 3012–3043.
- (12) Barbosa, E. G.; Bega, L. a S.; Beatriz, A.; Sarkar, T.; Hamel, E.; do Amaral, M. S.; de Lima, D. P. A Diaryl Sulfide, Sulfoxide, and Sulfone Bearing Structural Similarities to Combretastatin A-4. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (6), 2685–2688.
- (13) Dong, F.-Y.; Jiang, R.-W. Research Progress of the Natural Products against Prostate Cancer. *Chin. J. Nat. Med.* **2011**, *9* (2), 81–89.
- (14) Gioti, K.; Tenta, R. Bioactive Natural Products against Prostate Cancer: Mechanism of Action and Autophagic/Apoptotic Molecular Pathways. *Planta Med.* **2015**, *81* (7), 543–562.
- (15) Singh, M.; Kaur, M.; Silakari, O. Flavones: An Important Scaffold for Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84* (0), 206–239.
- (16) Alvarez, E. A.; Wolfson, A. H.; Pearson, J. M.; Crisp, M. P.; Mendez, L. E.; Lambrou, N. C.;

- Lucci, J. A. A Phase I Study of Docetaxel as a Radio-Sensitizer for Locally Advanced Squamous Cell Cervical Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2009**, *113* (2), 195–199.
- (17) Biganzoli, L.; Licitra, S.; Moretti, E.; Pestrin, M.; Zafarana, E.; Di Leo, A. Taxanes in the Elderly: Can We Gain as Much and Be Less Toxic? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2009**, *70* (3), 262–271.
- (18) Kingston, D. G. I. A Natural Love of Natural Products. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (11), 3975–3984.
- (19) Shah, U.; Shah, R.; Acharya, S.; Acharya, N. Novel Anticancer Agents from Plant Sources. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11* (1), 16–23.
- (20) Khazir, J.; Mir, B. A.; Pilcher, L.; Riley, D. L. Role of Plants in Anticancer Drug Discovery. *Phytochem. Lett.* **2014**, *7* (1), 173–181.
- (21) McLaughlin, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (7), 1311–1321.
- (22) Coothankandaswamy, V.; Liu, Y.; Mao, S.-C.; Morgan, J. B.; Mahdi, F.; Jekabsons, M. B.; Nagle, D. G.; Zhou, Y.-D. The Alternative Medicine Pawpaw and Its Acetogenin Constituents Suppress Tumor Angiogenesis via the HIF-1/VEGF Pathway. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (5), 956–961.
- (23) Paramasivam, A.; Sambantham, S.; Shabnam, J.; Vijayashree, J.; Jayaraman, G. Anti-Cancer Effects of Thymoquinone in Mouse Neuroblastoma ( Neuro-2a ) Cells through Caspase-3 Activation with down-Regulation of XIAP. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213* (2), 151–159.
- (24) Nobili, S.; Lippi, D.; Witort, E.; Donnini, M.; Bausi, L.; Mini, E.; Capaccioli, S. Natural Compounds for Cancer Treatment and Prevention. *Pharmacol. Res.* **2009**, *59* (6), 365–378.
- (25) National Cancer Institute. NCI. Developmental Therapeutics Program <https://dtp.cancer.gov/dtpstandard/servlet/dwindex?searchtype=NSC&chemnameboolean=and&outputformat=html&searchlist=295156&Submit=Submit> (accessed Sep 6, 2018).
- (26) National Cancer Institute. NCI. Developmental Therapeutics Program <https://dtp.cancer.gov/dtpstandard/servlet/dwindex?searchtype=NSC&chemnameboolean=and&outputformat=html&searchlist=698249&Submit=Submit> (accessed Sep 6, 2018).
- (27) Nagaraju, G. P.; Zhu, S.; Ko, J. E.; Ashritha, N.; Kandimalla, R.; Snyder, J. P.; Shoji, M.; El-

- Rayes, B. F. Antiangiogenic Effects of a Novel Synthetic Curcumin Analogue in Pancreatic Cancer. *Cancer Lett.* **2015**, *357* (2), 557–565.
- (28) Ferreira, A. K.; De-Sá-Júnior, P. L.; Pasqualoto, K. F. M.; De Azevedo, R. A.; Câmara, D. A. D.; Costa, A. S.; Figueiredo, C. R.; Matsuo, A. L.; Massaoka, M. H.; Auada, A. V. V.; et al. Cytotoxic Effects of Dillapiole on MDA-MB-231 Cells Involve the Induction of Apoptosis through the Mitochondrial Pathway by Inducing an Oxidative Stress While Altering the Cytoskeleton Network. *Biochimie* **2014**, *99* (1), 195–207.
- (29) Greenshields, A. L.; Doucette, C. D.; Sutton, K. M.; Madera, L.; Annan, H.; Yaffe, P. B.; Knickle, A. F.; Dong, Z.; Hoskin, D. W. Piperine Inhibits the Growth and Motility of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancer Lett.* **2015**, *357* (1), 129–140.
- (30) Bezerra, D. P.; Pessoa, C.; De Moraes, M. O.; Saker-Neto, N.; Silveira, E. R.; Costa-Lotufo, L. V. Overview of the Therapeutic Potential of Piplartine (Piperlongumine). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 453–463.
- (31) Rao, C. V.; Kurkjian, C. D.; Yamada, H. Y. Mitosis-Targeting Natural Products for Cancer Prevention and Therapy. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13* (14), 1820–1830.
- (32) Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (5), 421–433.
- (33) Bailly, C. Contemporary Challenges in the Design of Topoisomerase II Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (7), 3611–3640.
- (34) Negi, A. S.; Gautam, Y.; Alam, S.; Chanda, D.; Luqman, S.; Sarkar, J.; Khan, F.; Konwar, R. Natural Antitubulin Agents: Importance of 3,4,5-Trimethoxyphenyl Fragment. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (3), 373–389.
- (35) Chaplin, D. J.; Hill, S. A. The Development of Combretastatin A4 Phosphate as a Vascular Targeting Agent. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2002**, *54* (5), 1491–1496.
- (36) Patterson, D. M.; Rustin, G. J. S. Vascular Damaging Agents. *Clin. Oncol.* **2007**, *19* (6), 443–456.
- (37) Lippert III, J. W. Vascular Disrupting Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (2), 605–615.
- (38) Yang, T.; Wang, Y.; Li, Z.; Dai, W.; Yin, J.; Liang, L.; Ying, X.; Zhou, S.; Wang, J.; Zhang, X.; et al. Targeted Delivery of a Combination Therapy Consisting of Combretastatin A4 and Low-Dose Doxorubicin against Tumor Neovasculation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8* (1), 81–92.
- (39) Siemann, D. W. The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for Its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer*



- Treat. Rev.* **2011**, *37* (1), 63–74.
- (40) Hinnen, P.; Eskens, F. A. L. M. Vascular Disrupting Agents in Clinical Development. *Br J Cancer* **2007**, *96* (8), 1159–1165.
- (41) Wu, X.-Y.; Ma, W.; Gurung, K.; Guo, C.-H. Mechanisms of Tumor Resistance to Small-Molecule Vascular Disrupting Agents: Treatment and Rationale of Combination Therapy. *J. Formos. Med. Assoc.* **2013**, *112* (3), 115–124.
- (42) Miller, D. D.; Patil, S. A.; Patil, R.; Pfeffer, L. M.; Miller, D. D. Chromenes: Potential New Chemotherapeutic Agents for Cancer. *Future Med. Chem.* **2013**, *5* (14), 1647–1660.
- (43) Mooney, C. J.; Nagaiah, G.; Fu, P.; Wasman, J. K.; Cooney, M. M.; Savvides, P. S.; Bokar, J. A.; Dowlati, A.; Wang, D.; Agarwala, S. S.; et al. A Phase II Trial of Fosbretabulin in Advanced Anaplastic Thyroid Carcinoma and Correlation of Baseline Serum-Soluble Intracellular Adhesion Molecule-1 with Outcome. *Thyroid* **2009**, *19* (3), 233–240.
- (44) Fulda, S. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins as Therapeutic Targets for Radiosensitization of Human Cancers. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38* (6), 760–766.
- (45) Dai, Y.; Desano, J.; Qu, Y.; Tang, W.; Meng, Y.; Lawrence, T. S.; Xu, L. Natural IAP Inhibitor Embelin Enhances Therapeutic Efficacy of Ionizing Radiation in Prostate Cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2011**, *1* (2), 128–143.
- (46) Cheng, Y.; Jiang, H.; Hsu, S.; Lin, L.; Wu, C.; Ghanta, V. K.; Hsueh, C. XIAP-Mediated Protection of H460 Lung Cancer Cells against Cisplatin. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *627* (1–3), 75–84.
- (47) Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. a; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (3), 219–234.
- (48) Rathore, R.; McCallum, J. E.; Varghese, E.; Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Overcoming Chemotherapy Drug Resistance by Targeting Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs). *Apoptosis* **2017**, *22* (7), 898–919.
- (49) Creagh, E. M. Caspase Crosstalk: Integration of Apoptotic and Innate Immune Signalling Pathways. *Trends Immunol.* **2014**, *35* (12), 631–640.
- (50) Rojas, M.; Salmen, S.; Berrueta, L. Muerte Celular Programada : Activación y Mecanismos de Regulación. *Rev. Médica la Extensión Port.* **2009**, *4* (3), 92–106.
- (51) Radogna, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Cancer-Type-Specific Crosstalk between Autophagy, Necroptosis and Apoptosis as a Pharmacological Target. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *94* (0), 1–11.
- (52) Fulda, S.; Debatin, K.-M. Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer

- Chemotherapy. *Oncogene* **2006**, *25* (34), 4798–4811.
- (53) Igney, F. H.; Krammer, P. H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (4), 277–288.
- (54) Lacasse, E. C.; Mahoney, D. J.; Cheung, H. H.; Plenchette, S.; Baird, S.; Korneluk, R. G. IAP-Targeted Therapies for Cancer. **2008**, *2*, 6252–6275.
- (55) Mannhold, R.; Fulda, S.; Carosati, E. IAP Antagonists: Promising Candidates for Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (5–6), 210–219.
- (56) Fulda, S.; Vucic, D. Targeting IAP Proteins for Therapeutic Intervention in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (4), 331–331.
- (57) Lukacs, C.; Belunis, C.; Crowther, R.; Danho, W.; Gao, L.; Goggin, B.; Janson, C. A.; Li, S.; Remiszewski, S.; Schutt, A.; et al. The Structure of XIAP BIR2: Understanding the Selectivity of the BIR Domains. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2013**, *69* (Pt 9), 1717–1725.
- (58) Wu, G.; Chai, J.; Suber, T. L.; Wu, J. W.; Du, C.; Wang, X.; Shi, Y. Structural Basis of IAP Recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *408* (6815), 1008–1012.
- (59) Shi, Y. A Conserved Tetrapeptide Motif: Potentiating Apoptosis through IAP-Binding. *Cell Death Differ.* **2002**, *9* (2), 93–95.
- (60) Riedl, S. J.; Shi, Y. Molecular Mechanisms of Caspase Regulation during Apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (11), 897–907.
- (61) Hunter, A. M.; Lacasse, E. C.; Korneluk, R. G. The Inhibitors of Apoptosis ( IAPs ) as Cancer Targets. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1543–1568.
- (62) Elsayy, M. A.; Martin, L.; Tikhonova, I. G.; Walker, B. Solid Phase Synthesis of Smac / DIABLO-Derived Peptides Using a ‘Safety-Catch’ Resin: Identification of Potent XIAP BIR3 Antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (17), 5004–5011.
- (63) Fulda, S. Smac Mimetics as IAP Antagonists. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, No. 0.
- (64) Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.-Y.; Qian, D.; Lu, J.; Qiu, S.; Bai, L.; Peng, Y.; Cai, Q.; Wang, S. Design of Small-Molecule Peptidic and Non-Peptidic Smac Mimetics. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1264–1277.
- (65) Dynek, J. N.; Vucic, D. Antagonists of IAP Proteins as Cancer Therapeutics. *Cancer Lett.* **2013**, *332* (2), 206–214.
- (66) Chessari, G.; Buck, I. M.; Day, J. E. H.; Day, P. J.; Iqbal, A.; Johnson, C. N.; Lewis, E. J.; Martins, V.; Miller, D.; Reader, M.; et al. Fragment-Based Drug Discovery Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins: Discovery of a Non-Alanine Lead Series with Dual

- Activity Against CIAP1 and XIAP. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (16), 6574–6588.
- (67) Clouatre, D. L. Kava Kava: Examining New Reports of Toxicity. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 85-90.
- (68) Jaramillo, M.; Manos, P. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). *Am. J. Bot.* **2001**, *88* (4), 706–716.
- (69) Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; et al. Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*. 1997.
- (70) Dyer, L. a.; Palmer, A. D. N.; Ki, I. K. J.; July, F. Q. F. *Piper : A Model Genus for Studies of Phytochemistry , Ecology , and Evolution*; 2004, pp. 118.
- (71) Sanubol, A.; Chaveerach, A.; Tanee, T.; Sudmoon, R. Pre-Clinical Evaluation of Extracts and Essential Oils from Betel-like Scent *Piper* Species Identified Potential Cancer Treatment. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **2017**, *14* (1), 89–102.
- (72) Calderón, Á. I.; Vázquez, Y.; Solís, P. N.; Caballero-George, C.; Zacchino, S.; Gimenez, A.; Pinzón, R.; Cáceres, A.; Tamayo, G.; Correa, M.; et al. Screening of Latin American Plants for Cytotoxic Activity. *Pharm. Biol.* **2006**, *44* (2), 130–140.
- (73) Durant-Archibold, A. A.; Santana, A. I.; Gupta, M. P. Ethnomedical Uses and Pharmacological Activities of Most Prevalent Species of Genus *Piper* in Panama: A Review. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *217*, 63–82.
- (74) Salehi, B.; Zakaria, Z. A.; Gyawali, R.; Ibrahim, S. A.; Rajkovic, J.; Shinwari, Z. K.; Khan, T.; Sharifi-Rad, J.; Ozleyen, A.; Turkdonmez, E.; et al. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules* **2019**, *24* (1364), 1–118.
- (75) Wang, Y.-H.; Lee, K.-H.; Long, C.-L.; Morris-Natschke, S.; Niu, H.-M.; Yang, J. Anticancer Principles from Medicinal *Piper* Plants. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4* (1), 8–16.
- (76) Wang, Y.-H.; Goto, M.; Wang, L.-T.; Hsieh, K.-Y.; Morris-Natschke, S. L.; Tang, G.-H.; Long, C.-L.; Lee, K.-H. Multidrug Resistance-Selective antiproliferative activity of *Piper* amide alkaloids and Synthetic Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (20), 4818–4821.
- (77) Li, S.; Lei, Y.; Jia, Y.; Li, N.; Wink, M.; Ma, Y. Piperine, a Piperidine Alkaloid from *Piper nigrum* Re-Sensitizes P-Gp, MRP1 and BCRP Dependent Multidrug Resistant Cancer Cells. *Phytomedicine* **2011**, *19* (1), 83–87.
- (78) Raj, L.; Ide, T.; Gurkar, A. U.; Foley, M.; Schenone, M.; Li, X.; Tolliday, N. J.; Golub, T. R.; Carr, S. a; Shamji, A. F.; et al. Selective Killing of Cancer Cells by a Small Molecule Targeting the Stress Response to ROS. *Nature* **2011**, *475* (7355), 231–234.

- (79) Orjala, J.; Mian, P.; Rali, T.; Sticher, O. Gibbilibols A-D, Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilibum*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (7), 939–941.
- (80) Benfica, P. L.; Ávila, R. I. de; Rodrigues, B. D. S.; Cortez, A. P.; Batista, A. C.; Gaeti, M. P. N.; Lima, E. M.; Rezende, K. R.; Valadares, M. C. 4-Nerolidylcatechol: Apoptosis by Mitochondrial Mechanisms with Reduction in Cyclin D1 at G0/G1 Stage of the Chronic Myelogenous K562 Cell Line. *Pharm. Biol.* **2017**, *55* (1), 1899–1908.
- (81) Brohem, C. A.; Sawada, T. C. H.; Massaro, R. R.; Almeida, R. L.; Rivelli, D. P.; Ropke, C. D.; da Silva, V. V.; de Lima, T. M.; Curi, R.; Barros, S. B. M.; et al. Apoptosis Induction by 4-Nerolidylcatechol in Melanoma Cell Lines. *Toxicol. Vitro.* **2009**, *23* (1), 111–119.
- (82) Peña, L.; Avella, E.; Puentes, A. Benzoquinona e Hidroquinona Preniladas y Otros Constituyentes Aislados de *Piper bogotense* C. DC. *Rev. Colomb. Química* **2000**, *29* (2), 25–37.

## **2. Capítulo 2: Screening de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer con diferentes especies del género *Piper***

### **2.1 Introducción**

El uso de plantas medicinales por el hombre es un recurso que ha sido utilizado desde tiempos inmemorables para tratar diferentes tipos de dolencias y enfermedades. Es precisamente a partir de este conocimiento etnobotánico, que se han sentado las bases para el descubrimiento de una gran variedad de compuestos químicos con diferentes propiedades químicas y farmacológicas<sup>1-4</sup>, convirtiendo a los productos naturales en una fuente importante e inestimable para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer<sup>5-8</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial y es una enfermedad que se caracteriza por causar diferentes alteraciones celulares, que generan un crecimiento descontrolado de células malignas que se pueden extender a otros tejidos del cuerpo, causando graves alteraciones en el organismo<sup>9</sup>. Hoy en día, los tratamientos médicos contra el cáncer no son solamente cada vez más costosos y de difícil acceso, sino que también presentan altos niveles de resistencia y toxicidad, causando un rápido deterioro en la calidad de vida de la mayoría de los pacientes que padecen esta enfermedad.

En el descubrimiento de nuevos principios activos para el tratamiento de la enfermedad del cáncer, los productos naturales juegan un papel fundamental<sup>10</sup>. El *screening* de citotoxicidad de diferentes extractos de plantas frente a líneas celulares de cáncer es una forma sencilla y relativamente económica de buscar fuentes potenciales de nuevos compuestos con actividad antitumoral<sup>11,12</sup>. Las especies vegetales del género *Piper*, se caracterizan por poseer una gran variedad de metabolitos con propiedades citotóxicas<sup>13-16</sup> y adicionalmente, se encuentran

ampliamente distribuidas en todo el territorio colombiano. Teniendo en cuenta la gran biodiversidad que tiene nuestro país y con el objetivo de encontrar una especie del género *Piper* con gran potencial antitumoral, en este capítulo, se evaluó el efecto citotóxico en células tumorales, de 28 extractos etanólicos, obtenidos de 16 especies diferentes del género *Piper*. El efecto citotóxico de los extractos etanólicos se determinó por medio del ensayo de reducción del MTT, frente a las líneas celulares de cáncer humano A549 (pulmón), PC-3 (próstata) y MDA-MB-231 (mama). Las especies vegetales que mostraron tener mayor potencial citotóxico fueron *P. eriopodon*, *P. bogotense* y *P. cumanense* con valores de IC<sub>50</sub> alrededor de 30 µg/mL para las tres líneas celulares evaluadas en el ensayo. El efecto citotóxico más potente fue obtenido con el extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon*, con valores de IC<sub>50</sub> de 17.7 µg/mL para A549, 11.8 µg/mL para PC-3 y 20.7 µg/mL para MDAMB-231. A continuación, se describen los aspectos más importantes en la realización del *screening* de actividad citotóxica.

## 2.2 Materiales y Métodos

### 2.2.1 Material vegetal

Las 16 especies vegetales del género *Piper* fueron colectadas en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Santander. Un espécimen de cada especie fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, e identificado por el biólogo Adolfo Jara Muñoz (ver Tabla 2-1).

### 2.2.2 Preparación de Extractos

Todas las plantas fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Posteriormente, las partes secas de las plantas (hojas, madera o inflorescencias) se sometieron a un proceso de molienda y extracción exhaustiva por maceración con etanol al 96%. Por cada extracto se realizaron tres extracciones a temperatura ambiente, cada una por un tiempo de 72 horas. Finalmente, se recuperó el solvente a presión reducida por rotavapor y se obtuvieron los diferentes extractos etanólicos, que posteriormente fueron evaluados en el ensayo de citotoxicidad.

### 2.2.3 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer humano A549 (pulmón), PC-3 (próstata) y MDA-MB-231 (mama), fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco), 2 mM de glutamina y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Lonza) en atmosfera húmeda a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.4 Ensayo de Citotoxicidad

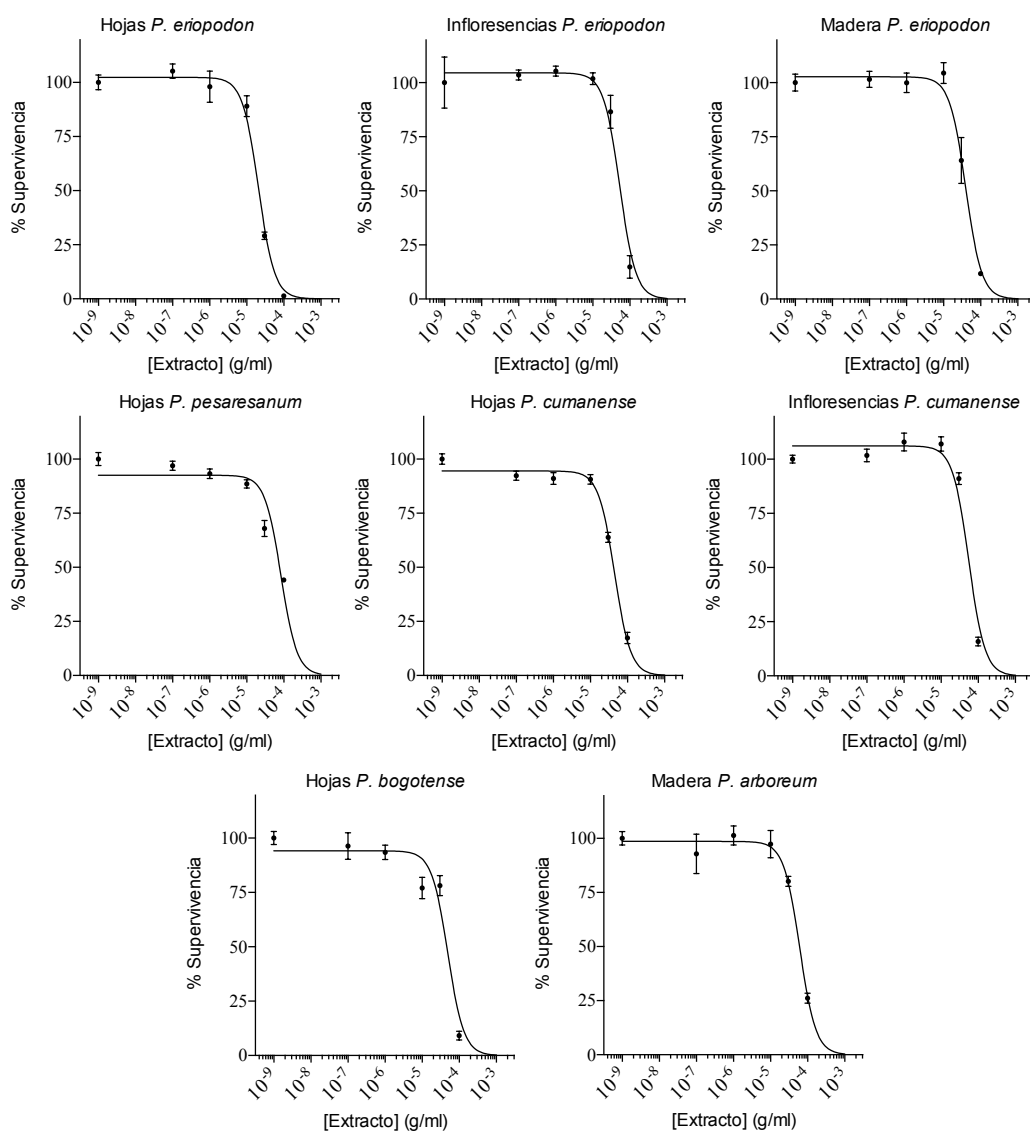
El efecto citotóxico de los extractos etanólicos se determinó por medio del ensayo de reducción del MMT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)<sup>17</sup>. Las células fueron sembradas en platos de 96 pozos (10<sup>4</sup> células/pozo) en 100 µL de medio suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina y se dejó en reposo durante 24 h en atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el medio fue removido y se aplicaron 100 µL de medio fresco, en concentraciones seriadas de (100, 30, 10, 1 y 0,1 µg/mL) de los extractos etanólicos disueltos en DMSO (0.2%). Después de 24 h, se retiró el medio, se agregaron 100 µL de la solución de MTT (0.5 mg/mL) en PBS y los platos se incubaron por un periodo de 4 h a 37°C en atmosfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se removió el sobrenadante, se agregaron 100 µL de buffer de lisis y se midió la absorbancia en un lector Tecan Sunrise (Hombrechtikon, Suiza) a  $\lambda = 595$  nm. Las células no tratadas se usaron como control positivo y la supervivencia celular se calculó como: % supervivencia = 100 (X/control), donde X es el promedio de la lectura del metabolismo de MTT en un grupo de tratamiento (n=4). Los valores de Concentración Inhibitoria 50 - IC<sub>50</sub> - (concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular) para los extractos etanólicos se calcularon usando el software GraphPad Prism. Los datos son reportados como el promedio  $\pm$  el error estándar.

### 2.2.5 Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de IC<sub>50</sub> fueron obtenidos por un análisis de la curva de regresión no lineal de respuesta al efecto de la concentración, utilizando el programa GraphPad Prism. Para cada línea celular, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANAVA), seguido de una prueba de comparación de Tukey. Todas las diferencias con p<0.05 fueron consideradas significativas.

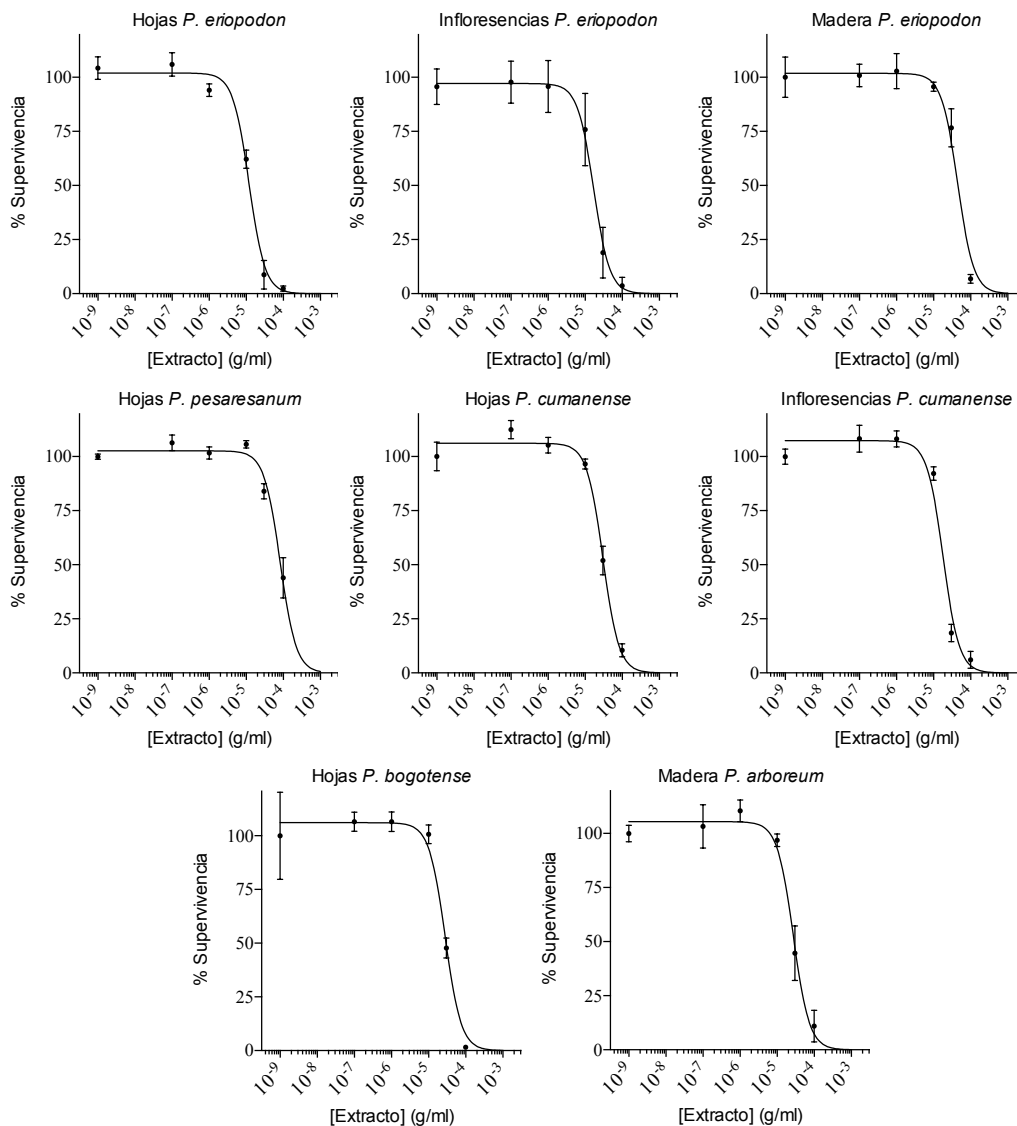
## 2.3 Resultados y Discusión

Las especies vegetales y las partes de las plantas empleadas para preparar cada extracto etanólico se muestran en la Tabla 2-1. En el ensayo de citotoxicidad, se evaluaron un total de 28 extractos etanólicos obtenidos a partir de 16 especies vegetales del género *Piper*. Los valores de IC<sub>50</sub> para los extractos evaluados, fueron calculados a partir de una curva completa dosis-respuesta frente a las tres líneas celulares A549, PC-3, MDA-MB-231 y se consideraron citotóxicos únicamente aquellos extractos que tuvieron valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 100 µg/mL (Figuras 2-1 a 2-3).



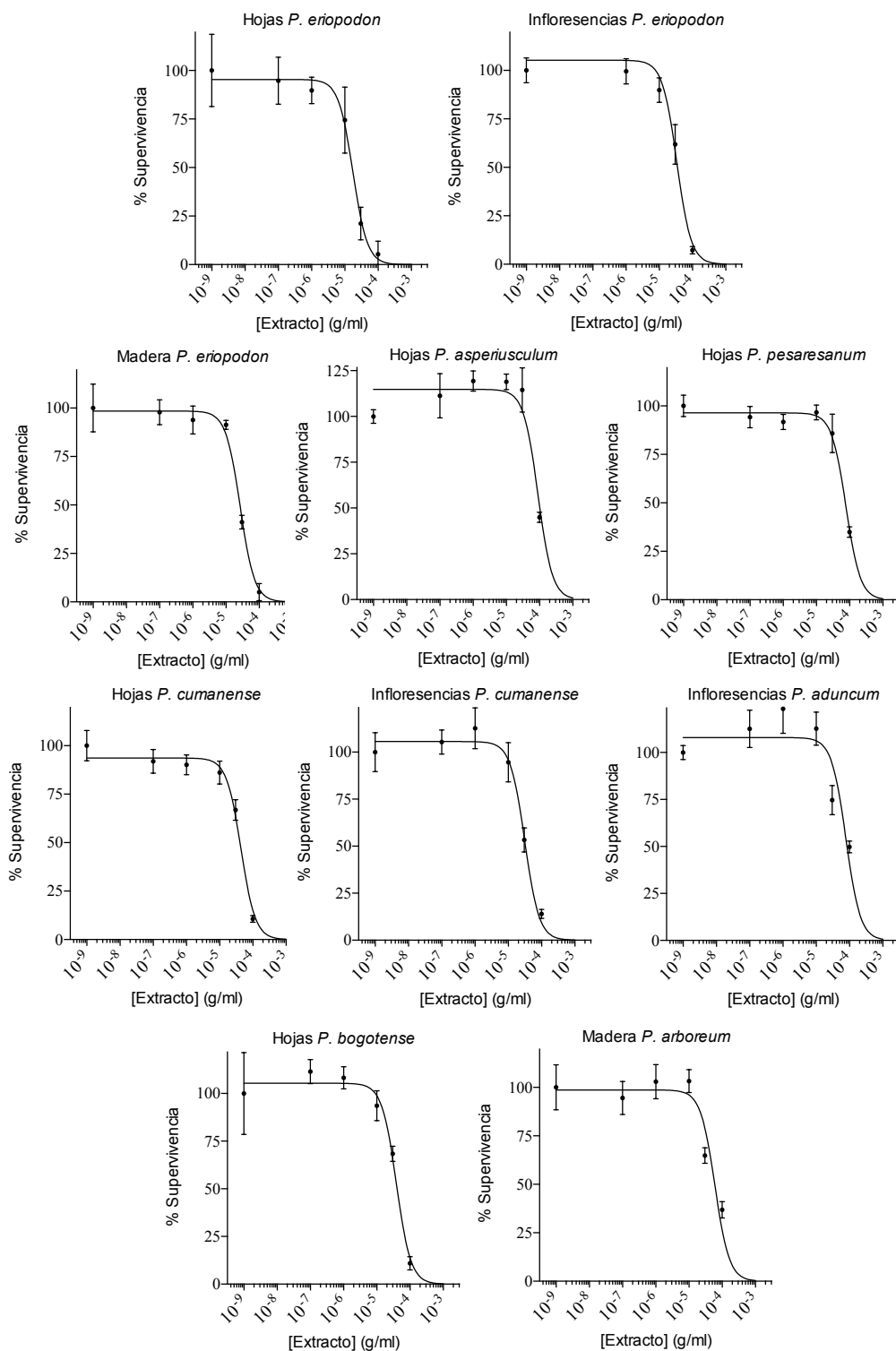
**Figura 2-1:** Curvas de viabilidad celular para la línea celular MDA-MB-231 frente a los extractos etanólicos de: *P. eriopodon* (hojas, inflorescencias y madera); *P. pesaresanum* (hojas); *P. cumanense* (hojas e inflorescencias); *P. bogotense* (hojas); *P. arboreum* (madera).





**Figura 2-2:** Curvas de viabilidad celular para la línea celular PC-3 frente a los extractos etanólicos de: *P. eriopodon* (hojas, inflorescencias y madera); *P. pesaresanum* (hojas); *P. cumanense* (hojas e inflorescencias); *P. bogotense* (hojas); *P. arboreum* (madera).

De los 28 extractos utilizados en el ensayo de citotoxicidad, se encontró que 10 de ellos mostraron tener efecto citotóxico frente a las líneas celulares de cáncer evaluadas. Estos 10 extractos que mostraron tener actividad citotóxica, inhibieron el crecimiento celular en una relación dosis-dependiente con valores de IC<sub>50</sub> menores de 100 µg/mL, 7 de ellos con valores de IC<sub>50</sub> menores a 50 µg/mL y 3 de ellos con valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 20 µg/mL. Los valores calculados de IC<sub>50</sub> para los extractos evaluados se muestran en la Tabla 2-1.



**Figura 2-3:** Curvas de viabilidad celular para la línea celular A549 frente a los extractos etanólicos de: *P. eriopodon* (hojas, inflorescencias y madera); *P. asperiusculum* (hojas); *P. pesaresanum* (hojas); *P. cumanense* (hojas e inflorescencias); *P. aduncum* (inflorescencias); *P. bogotense* (hojas); *P. arboreum* (madera).

**Tabla 2-1.** Plantas y extractos de las partes de las plantas utilizadas para realizar el ensayo de citotoxicidad frente a las líneas celulares: A549, PC-3 y MDA-MB-231

Especies	Numero de Colección	Parte de la planta	IC <sub>50</sub> (µg/mL)*		
			Pulmón A549	Próstata PC-3	Mama MDA-MB-231
<i>Piper aduncum</i>	COL 595171	Hojas	> 100	> 100	> 100
		Inflorescencias	78.16 ± 10.7 <sup>a</sup>	> 100	> 100
<i>Piper amalago</i>	COL 510519	Hojas	> 100	> 100	> 100
<i>Piper arboreum</i>	COL 519815	Hojas	> 100	> 100	> 100
		Madera	60.29 ± 7.22 <sup>b</sup>	27.25 ± 2.08 <sup>a</sup>	61.29 ± 3.65 <sup>a</sup>
<i>Piper arthante</i>	COL 515965	Madera	> 100	> 100	> 100
<i>Piper cf. asperiusculum</i>	COL 579924	Hojas	89.45 ± 10.3 <sup>c</sup>	> 100	> 100
		Inflorescencias	> 100	> 100	> 100
<i>Piper bogotense</i>	COL 517696	Hojas	38.83 ± 3.89 <sup>de</sup>	27.89 ± 2.44 <sup>b</sup>	49.21 ± 5.22 <sup>b</sup>
		Inflorescencias	> 100	> 100	> 100
<i>Piper cumanense</i>	COL 518183	Hojas	43.78 ± 3.23 <sup>e</sup>	30.08 ± 1.59 <sup>b</sup>	44.75 ± 1.85 <sup>c</sup>
		Inflorescencias	31.10 ± 2.56 <sup>f</sup>	18.03 ± 1.35 <sup>c</sup>	55.78 ± 4.07 <sup>d</sup>
<i>Piper el bancoanum</i>	COL 518182	Hojas	> 100	> 100	> 100
<i>Piper eriocladum</i>	COL 517694	Madera	> 100	> 100	> 100
		Madera	> 100	> 100	> 100
<i>Piper cf. eriopodon</i>	COL 516757	Hojas	17.84 ± 2.24 <sup>g</sup>	11.88 ± 0.69 <sup>d</sup>	20.75 ± 1.12 <sup>e</sup>
		Inflorescencias	33.74 ± 3.83 <sup>df</sup>	16.90 ± 1.85 <sup>c</sup>	53.22 ± 4.22 <sup>d</sup>
		Madera	26.60 ± 1.85 <sup>f</sup>	44.70 ± 3.70 <sup>e</sup>	39.56 ± 2.51 <sup>f</sup>
<i>Piper hispidum</i>	COL 510518	Hojas	> 100	> 100	> 100
		Raíces	> 100	> 100	> 100
<i>Piper holtonii</i>	COL 517184	Madera	> 100	> 100	> 100
		Hojas	> 100	> 100	> 100
<i>Piper marginatum</i>	COL 591820	Madera	> 100	> 100	> 100
		Hojas	> 100	> 100	> 100
<i>Piper peltatum</i>	COL 512098	Hojas	> 100	> 100	> 100
<i>Piper pertomentellum</i>	COL 579920	Hojas	> 100	> 100	> 100
		Inflorescencias	> 100	> 100	> 100
<i>Piper pesaresanum</i>	COL 553307	Hojas	77.41 ± 4.92 <sup>g</sup>	82.51 ± 4.75 <sup>f</sup>	83.63 ± 7.23 <sup>g</sup>

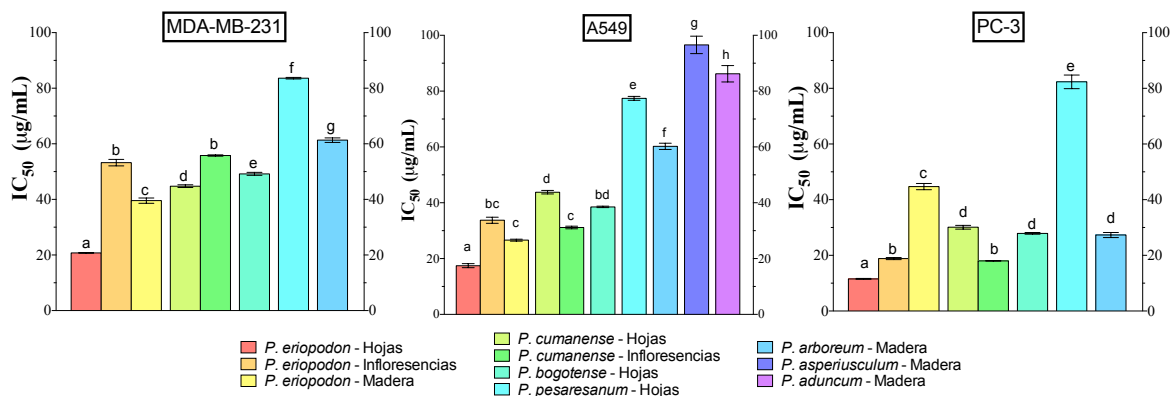
\*Los valores marcados con letras diferentes presentan diferencia significativa (Tuckey, p < 0.05).

La línea celular de cáncer de pulmón (A549) mostró la respuesta más sensible a los extractos etanólicos evaluados, donde 10 extractos inhibieron su crecimiento celular con valores de  $IC_{50}$  inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ , en contraste con las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3) y mama (MDA-MB-231), donde 8 extractos presentaron actividad citotóxica con valores de  $IC_{50}$  menores a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Por otro lado, los extractos etanólicos de hojas de *P. aduncum* y *P. asperiusculum* presentaron actividad citotóxica moderada únicamente contra células de cáncer de pulmón (A549). Reportes previos en la especie vegetal *P. aduncum* han demostrado la presencia de dilapiol, un compuesto de tipo arilpropano que ha sido aislado de diferentes especies del género *Piper* y que es capaz de inducir apoptosis en células tumorales por activación de la vía intrínseca<sup>18</sup>. También, se ha reportado que el extracto etanólico de las hojas de *P. aduncum* posee actividad citotóxica contra en células de cáncer de cérvix (HeLa,  $IC_{50}$  = 3.91  $\mu\text{g/mL}$ ) y el extracto de diclorometano contra células de cáncer de nasofaringe (KB,  $IC_{50}$  = 12  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>19</sup>, mama (MCF7,  $IC_{50}$  = 27  $\mu\text{g/mL}$ ), pulmón (H-460,  $IC_{50}$  = 25  $\mu\text{g/mL}$ ) y neuroblastoma (SF-268,  $IC_{50}$  = 23  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>11</sup>, mientras que para la especie vegetal *P. asperiusculum* no se encontraron reportes previos.

En estudios previos de citotoxicidad en células tumorales, realizados sobre sobre 310 especies diferentes de plantas colectadas en países latinoamericanos como Argentina, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Nicaragua y Panamá; *P. bogotense* fue una de las especies vegetales más activas, a partir de la cual obtuvieron por medio de un fraccionamiento bioguiado de las hojas, el compuesto de tipo quinona (2'E,6'E)-2-farnesil-1,4-benzoquinona, que mostró tener gran potencial citotóxico frente a líneas celulares de cáncer de glioblastoma (SF-268,  $IC_{50}$  = 3.5  $\mu\text{g/mL}$ ), mama (MCF7,  $IC_{50}$  = 1.8  $\mu\text{g/mL}$ ) y pulmón (H-460,  $IC_{50}$  = 4.8  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>11</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre las líneas celulares de cáncer humano A549, PC-3 y MDA-MB-231, confirman el gran potencial citotóxico de las hojas de *P. bogotense* en diferentes tipos de líneas celulares de cáncer humano.

Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, un extracto se puede considerar activo cuando tiene un valor de  $IC_{50}$  < 30  $\mu\text{g/mL}$ <sup>20</sup>. Los extractos etanólicos de *P. eriopodon*, *P. cumanense* y *P. bogotense* mostraron valores de  $IC_{50}$  menores a 30  $\mu\text{g/mL}$  contra células de cáncer humano, lo que sugiere la existencia de compuestos con propiedades citotóxicas en estas especies vegetales del género *Piper*. En este trabajo, se reporta por primera vez el potencial citotóxico de las especies vegetales *P. eriopodon*, *P. cumanense*, *P. pesaresanum* y *P. bogotense*, contra las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3), mama (MDA-MB-231) y

pulmón (A549). Los resultados obtenidos indican que estos extractos etanólicos pueden inhibir el crecimiento de las células de cáncer evaluadas y merecen ser evaluados en diferentes líneas celulares de cáncer, así como también podrían ser considerados como una fuente potencial para el aislamiento de nuevos compuestos con actividad antitumoral.



**Figura 2-4:** Extractos etanólicos de especies del género *Piper*, que presentaron actividad citotóxica frente a las líneas celulares evaluadas con valores de IC<sub>50</sub> menores a 100 µg/mL. Las barras marcadas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Para poder comparar los diferentes valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con los extractos etanólicos que mostraron tener actividad citotóxica, se realizó una prueba de significancia para cada línea celular. Estos datos fueron analizados a través de un Análisis de Varianza, seguido por un test de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los resultados mostraron que existen diferencias significativas para la mayoría de los extractos en cada una de las líneas celulares evaluadas. El extracto que mostró la menor actividad citotóxica fue el extracto etanólico de madera de *P. asperiusculum*, mientras que el extracto de hojas de la especie vegetal *P. eriopodon* presentó el efecto citotóxico más potente frente a líneas celulares de cáncer humano de pulmón (A549), próstata (PC-3) y mama (MDA-MB-231) (Figura 2-4).

Los resultados obtenidos indican que los extractos etanólicos que mostraron tener el efecto citotóxico más potente contra las líneas celulares de cáncer evaluadas, corresponden a los extractos que fueron obtenidos de las hojas, inflorescencias y madera de *P. eriopodon*, siendo el extracto etanólico de las hojas el que presentó los valores de IC<sub>50</sub> más bajos, con valores de IC<sub>50</sub> de 11.88, 17.84 y 20.75 µg/mL para las líneas celulares PC-3, MDA-MB-231 y A549 respectivamente.

De las 16 especies colombianas del género *Piper* mostradas en la Tabla 2-1, cinco de ellas (*P. arboreum*, *P. bogotense*, *P. cumanense*, *P. eriopodon* y *P. pesaresanum*) mostraron tener efectos citotóxicos frente a las tres líneas celulares de cáncer evaluadas y dos más de ellas (*P. aduncum* y *P. asperiusculum*) mostraron tener efecto citotóxico en al menos una de las tres líneas celulares. Estos resultados demuestran la gran importancia que tienen las especies del género *Piper* en la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica y están acordes a lo reportado por diferentes autores que proponen a este género como una fuente importante en la obtención de diferentes compuestos con actividad antitumoral<sup>13,21,22</sup>.

Finalmente, basados en los resultados de actividad citotóxica obtenidos para las 16 especies evaluadas del género *Piper*, se decidió escoger la especie vegetal *P. eriopodon* para realizar un estudio fitoquímico y tratar de encontrar los compuestos responsables de su actividad citotóxica en el extracto etanólico de las hojas.

## 2.4 Conclusiones

Se evaluó la actividad citotóxica de 28 extractos etanólicos obtenidos de 16 especies vegetales colombianas del género *Piper*, sobre células de cáncer humano de pulmón (A549), próstata (PC-3) y mama (MDA-MB-231). De los 28 extractos evaluados en el ensayo de citotoxicidad, se encontró que 10 de ellos mostraron tener efecto citotóxico frente a las líneas celulares de cáncer evaluadas, inhibiendo el crecimiento celular en una relación dosis-dependiente con valores de IC<sub>50</sub> menores de 100 µg/mL, 7 de ellos con valores de IC<sub>50</sub> menores a 50 µg/mL y 3 de ellos con valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 20 µg/mL.

El género *Piper* constituye una fuente importante en la búsqueda de nuevos agentes citotóxicos, ya que de las 16 especies evaluadas en este capítulo, *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. asperiusculum*, *P. bogotense*, *P. cumanense*, *P. eriopodon* y *P. pesaresanum* mostraron tener efectos citotóxicos al menos frente a una de las tres líneas celulares de cáncer, con valores IC<sub>50</sub> por debajo de 100 µg/mL y 5 de ellas (*P. arboreum*, *P. bogotense*, *P. cumanense*, *P. eriopodon* y *P. pesaresanum*) frente a las tres líneas celulares evaluadas.

Las especies de *Piper* que mostraron tener el mayor potencial citotóxico frente a las líneas celulares de cáncer humano de pulmón (A549), próstata (PC-3) y mama (MDA-MB-231), fueron *P. eriopodon*, *P. bogotense* y *P. cumanense*, con valores de IC<sub>50</sub> menores a 30 µg/mL en cada una de ellas. El extracto etanólico de las hojas de *P. eriopodon* mostró tener el efecto

citotóxico más potente frente a las tres líneas celulares evaluadas con valores de IC<sub>50</sub> de 11.88 µg/mL para cáncer de próstata (PC-3), 17.84 µg/mL para cáncer de mama (MDA-MB-231) y 20.75 µg/mL para cáncer de pulmón (A549). Por esta razón, se seleccionó el extracto etanólico de hojas de la especie vegetal *P. eriopodon* para realizar un estudio fitoquímico, en busca de los compuestos responsables de su potente actividad citotóxica.

## 2.5 Bibliografía

- (1) Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (2), 111–129.
- (2) Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (6), 3670–3695.
- (3) Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* **2018**, *5* (93), 1–16.
- (4) Fridlender, M.; Kapulnik, Y.; Koltai, H. Plant Derived Substances with Anti-Cancer Activity: From Folklore to Practice. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6* (799), 1–9.
- (5) Khazir, J.; Mir, B. A.; Pilcher, L.; Riley, D. L. Role of Plants in Anticancer Drug Discovery. *Phytochem. Lett.* **2014**, *7* (1), 173–181.
- (6) Guerra, A. R.; Duarte, M. F.; Duarte, I. F. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (41), 10663–10658.
- (7) Shah, U.; Shah, R.; Acharya, S.; Acharya, N. Novel Anticancer Agents from Plant Sources. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11* (1), 16–23.
- (8) Neidle, S.; Arimondo, P. B.; Guilbaud, N.; Bailly, C. *Cancer Drug Design and Discovery*, Second edi.; Neidle, S., Ed.; Elsevier, 2014, pp. 91.
- (9) WHO. *World Cancer Report 2014*; Stewart, B. W., Wild, C. P., Eds.; WHO: Lyon, 2014.
- (10) Lichota, A.; Gwozdziński, K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (3533), 1–38.
- (11) Calderón, Á. I.; Vázquez, Y.; Solís, P. N.; Caballero-George, C.; Zacchino, S.; Gimenez, A.; Pinzón, R.; Cáceres, A.; Tamayo, G.; Correa, M.; et al. Screening of Latin American Plants for Cytotoxic Activity. *Pharm. Biol.* **2006**, *44* (2), 130–140.
- (12) Altemimi, A.; Lakhssassi, N.; Baharlouei, A.; Watson, D. G.; Lightfoot, D. A.

- Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants* **2017**, *6* (42), 1–23.
- (13) Wang, Y.-H.; Lee, K.-H.; Long, C.-L.; Morris-Natschke, S.; Niu, H.-M.; Yang, J. Anticancer Principles from Medicinal Piper Plants. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4* (1), 8–16.
- (14) Wiart, C.; Wiart, C. Alkaloids. In *Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Cancer*; Academic Press, 2013; pp 1–95.
- (15) Mgbeahuruike, E. E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H.; Holm, Y. Bioactive Compounds from Medicinal Plants: Focus on Piper Species. *South African J. Bot.* **2017**, *112*, 54–69.
- (16) Piska, K.; Gunia-Krzyżak, A.; Koczurkiewicz, P.; Wójcik-Pszczola, K.; Pękala, E. Piperlongumine (Piplartine) as a Lead Compound for Anticancer Agents – Synthesis and Properties of Analogues: A Mini-Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 13–20.
- (17) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- (18) Ferreira, A. K.; De-Sá-Júnior, P. L.; Pasqualoto, K. F. M.; De Azevedo, R. A.; Câmara, D. A. D.; Costa, A. S.; Figueiredo, C. R.; Matsuo, A. L.; Massaoka, M. H.; Auada, A. V. V.; et al. Cytotoxic Effects of Dillapiole on MDA-MB-231 Cells Involve the Induction of Apoptosis through the Mitochondrial Pathway by Inducing an Oxidative Stress While Altering the Cytoskeleton Network. *Biochimie* **2014**, *99* (1), 195–207.
- (19) Orjala, J.; Wright, A. D.; Behrends, H.; Folkers, G.; Sticher, O.; Rüegger, H.; Rali, T. Cytotoxic and Antibacterial Dihydrochalcones from Piper Aduncum. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (1), 18–26.
- (20) Suffness, M.; Pezzuto, J. M. *Methods in Plant Biochemistry, Volume 6: Assays for Bioactivity*; Hostettmann, K., Ed.; Academic Press: London, 1991.
- (21) Sanubol, A.; Chaveerach, A.; Tanee, T.; Sudmoon, R. Pre-Clinical Evaluation of Extracts and Essential Oils from Betel-like Scent Piper Species Identified Potential Cancer Treatment. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **2017**, *14* (1), 89–102.
- (22) Rekha, V. P. B.; Kollipara, M.; Srinivasa Gupta, B. R. S. S.; Bharath, Y.; Pulicherla, K. K. A Review on Piper Betle L.: Nature's Promising Medicinal Reservoir. *Am. J. Ethnomedicine* **2014**, *1* (5), 276–289.



## 3. Capítulo 3: Estudio fitoquímico de *P. eriopodon*

### 3.1 Introducción

El género *Piper* es considerado como el género más importante de la familia Piperaceae y existen diferentes clases de estudios fitoquímicos, donde se reporta una gran variedad de compuestos como amidas, flavonoides, kavapironas, lignanos, neolignanos, piperólidos, propenilfenoles y terpenos, que hacen de este género una fuente importante y variada de estructuras químicas con diferentes características biológicas<sup>1-3</sup>. Algunos arilpropanos como el dilapiol y amidas como la pipartina, son algunos ejemplos de compuestos con potente actividad citotóxica, que han sido aislados de diferentes especies del género *Piper* y han demostrado ampliamente su capacidad de inducir apoptosis frente a una gran variedad de líneas celulares tumorales tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*<sup>4</sup>. Otros compuestos de tipo fenólico como los gibbillimboles A-D aislados de *P. gibbillimum*, los sarmentosumoles A-F aislados de *P. sarmentosum*, el hidroxichavicol aislado de *P. betel* y el 4-nerodilcatecol aislado de *P. umbellata* L., son algunos ejemplos de alquenilfenoles característicos del género *Piper* y que también han demostrado su potencial citotóxico y antitumoral en una gran variedad de líneas celulares de cáncer, evaluadas en diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*<sup>5-9</sup>.

Los reportes previos sobre la especie *P. eriopodon* corresponden a estudios realizados principalmente sobre la parte aérea y que involucran la determinación de actividad antioxidante y antifúngica<sup>10</sup>. Igualmente, en nuestro grupo de investigación se habían realizado algunos estudios previos sobre el potencial insecticida de *P. eriopodon* contra larvas de *Spodoptera frugiperda* y la determinación de su potencial antifúngico contra el hongo *Fusarium oxysporum*, donde se encontraron algunos metabolitos de tipo alquilfenol como el gibbillimbol B que mostró tener actividad antifúngica. Sin embargo, este estudio es el primer trabajo que se realiza sobre el efecto citotóxico que posee *P. eriopodon* en líneas celulares de

cáncer humano. En este capítulo se presenta el estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *P. eriopodon*, que mostró tener el mayor potencial citotóxico frente a las líneas celulares tumorales evaluadas en el screening de citotoxicidad. Este estudio se realizó enfocado en la búsqueda de los compuestos responsables de dicha actividad citotóxica, partiendo de un fraccionamiento por polaridad creciente y únicamente se continuó el estudio cromatográfico a partir de las fracciones que mostraron tener actividad citotóxica. De esta forma, del extracto etanólico de las hojas se aislaron nueve compuestos cuya estructura molecular fue determinada por diferentes métodos espectroscópicos, principalmente por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono en una y dos dimensiones, y espectrometría de masas de alta resolución. A continuación, se presenta una breve descripción del aislamiento, la elucidación estructural y la determinación del potencial citotóxico de los compuestos obtenidos del extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon*, el cual mostró tener el efecto citotóxico más potente en los ensayos realizados frente a las líneas celulares de cáncer evaluadas en el capítulo anterior.

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Material vegetal

La especie vegetal *P. eriopodon* fue colectada en el municipio de Fusagasugá (Cundinamarca) por el profesor Wilman Antonio Delgado Avila y clasificada por el biólogo Adolfo Jara Muñoz del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Un espécimen reposa en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número de colección COL516757. Para la obtención del extracto etanólico, se tomaron las hojas de *P. eriopodon* secas y molidas (1.14 Kg) y se sometieron a un proceso exhaustivo de extracción por maceración con etanol al 96%. Posteriormente, para obtener el extracto etanólico se realizó un proceso de filtración y el solvente fue retirado a presión reducida con ayuda de un rotavapor, obteniéndose finalmente 103.6 g del extracto.

### 3.2.2 General

Todos los solventes utilizados durante el fraccionamiento y purificación fueron grado analítico marca Merck. Para la cromatografía flash, se utilizó como fase estacionaria sílica gel 60 (0.040 – 0.063 mm; Merck) y para la cromatografía en columna se utilizaron como fases estacionarias

sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck) y Sephadex® LH20 (Sigma-Aldrich). Los espectros de masas de alta resolución fueron tomados en un equipo Agilent Technologies Q-TOF, usando ionización por electrospray (ESI) en modo negativo. Los espectros de RMN  $^1\text{D}$  y  $^2\text{D}$  fueron registrados en un equipo Bruker Avance 400 (400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), utilizando como patrón de referencia los picos de los solventes  $\text{CDCl}_3$  y MeOD (Merck).

### 3.2.3 Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon*

100 g del extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon* fueron fraccionados sobre sílica gel por medio de cromatografía flash, utilizando como fase móvil un sistema de solventes tolueno/acetato de etilo en polaridad creciente (0-100%) para obtener 8 fracciones. La actividad citotóxica fue retenida en las fracciones 1 (34.2 g) y 2 (8.0 g). La fracción 1 posteriormente fue sometida a un nuevo fraccionamiento por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando un sistema de solventes n-hexano/diclorometano/acetato de etilo (25:70:5), para obtener 10 fracciones (A-J). La fracción E (12.5 g) se fraccionó nuevamente por medio de Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil una mezcla de solventes n-hexano/cloroformo/metanol (2:2:1), a partir de la cual se recolectaron 6 fracciones (E1-E6). El compuesto 1 (7.93 g) fue obtenido después de someter la fracción E3 a una cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil un sistema de solventes n-hexano/acetona/metanol (2:2:1). La fracción E4 (974,6 mg) fue sometida a un fraccionamiento sobre Sephadex LH-20 y fue eluída con una mezcla de solventes de n-hexano/acetona/metanol (2:2:1) para obtener 6 fracciones (E4.1-E4.6). El compuesto 3 (33.2 mg) fue obtenido a partir del fraccionamiento de E4.4 (378.8 mg) sobre Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil una mezcla de los solventes n-hexano/acetona/metanol (2:2:1) y una posterior purificación por cromatografía en columna, eluída con hexano/acetona (8:2). La fracción E4.5 (266.4 mg) fue fraccionada sobre Sephadex LH-20 utilizando una mezcla n-hexano/cloroformo/metanol (2:2:1) para obtener 4 fracciones (E4.5.1-E4.5.4). Las fracciones E4.5.2 (31.7 mg) y E4.5.4 (70.8 mg) fueron sometidas a una purificación por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando como fase móvil una mezcla de solventes n-hexano/acetona (8:2) para obtener el compuesto 6 (28.8 mg).

La fracción E5 (2.19 g) fue fraccionada por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando como fase móvil una mezcla de tolueno/acetato de etilo (9:1) para obtener 10

fracciones (E5.1 a E5.10). El compuesto 4 (20.0 mg) fue obtenido de la fracción E5.3 (153.2 mg) a través de una cromatografía flash, utilizando como fase móvil una mezcla hexano/acetona (9:1).

La fracción E6 (1.03 g) fue fraccionada por medio de cromatografía flash utilizando como fase móvil una mezcla cloroformo/acetona (9:1), obteniendo 6 fracciones (E6.1-E6.6). La fracción E6.5 (232.2 mg) fue fraccionada por medio de Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil una mezcla de n-hexano/cloroformo/metanol (2:2:1) para obtener el compuesto 9 (9.3 mg).

La fracción 2 (8.0 g) se sometió a un fraccionamiento por medio de cromatografía en columna utilizando como fase móvil una mezcla de solventes de n-hexano/acetato de etilo (8:2) para obtener 7 fracciones (K-Q). La fracción Q, fue sometida a cromatografía flash, utilizando como fase móvil un sistema de solventes diclorometano/acetona (7:3), obteniendo 6 fracciones (Q1-Q6). La fracción Q3 (1.44 g) fue fraccionada por medio de Sephadex LH-20 con una mezcla de solventes n-hexano/acetona/metanol (2:2:1), obteniendo seis fracciones (Q3.1-Q3.6). La fracción Q3.4 (239.4 mg) fue luego sometida a un nuevo fraccionamiento por Sephadex LH20 con n-hexano/cloroformo/metanol (2:2:1) y luego purificada por medio una cromatografía en columna sobre sílica, utilizando como fase móvil una mezcla de n-hexano/acetona (7:3) para obtener el compuesto 5 (4.0 mg). La fracción Q6 (570.5 mg) fue fraccionada por medio de cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla n-hexano/acetona (7:3) para obtener 7 fracciones (Q6.1-Q6.7), obteniendo en la fracción Q6.1 el compuesto 2 (166,0 mg) y en la fracción Q6.7 el compuesto 7 (40.3 mg). Finalmente, la fracción Q6.5 (555.1 mg) fue fraccionada por medio de Sephadex LH20 utilizando como fase móvil un sistema de solventes n-hexano/cloroformo/metanol (2:2:1) para obtener el compuesto 8 (8.7 mg).

### 3.2.4 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama), fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco), 2 mM de glutamina y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Lonza) en atmosfera húmeda a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.5 Ensayo de Citotoxicidad

El efecto citotóxico de los compuestos aislados, se evaluó por medio del ensayo de reducción del MMT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)<sup>11</sup>. Las células fueron

sembradas en platos de 96 pozos ( $10^4$  células/pozo) en 100  $\mu\text{L}$  de medio suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina y se dejó en reposo durante 24 h en atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, el medio fue removido y se aplicaron 100  $\mu\text{L}$  de medio fresco, que contenía los compuestos en concentraciones seriadas de (100, 30, 10, 1.0 y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los compuestos disueltos en DMSO (0.2%). Después de 24 h, se retiró el medio, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de MTT (0.5 mg/mL) en PBS y los platos se incubaron por un periodo de 4 h a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda y 5%  $\text{CO}_2$ . Finalmente, se removió el sobrenadante, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis y se midió la absorbancia en un lector de placas Glomax Multi Detection System (Promega, Milano, Italia). Las células no tratadas se usaron como control positivo y la supervivencia celular se calculó como: % supervivencia =  $100 (X/\text{control})$ , donde X es el promedio de la lectura del metabolismo de MTT en un grupo de tratamiento ( $n=4$ ). Los valores de Concentración Inhibitoria 50 -  $\text{IC}_{50}$  - (concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular) para los extractos etanólicos se calcularon usando el software GraphPad Prism.

### 3.3 Resultados y Discusión

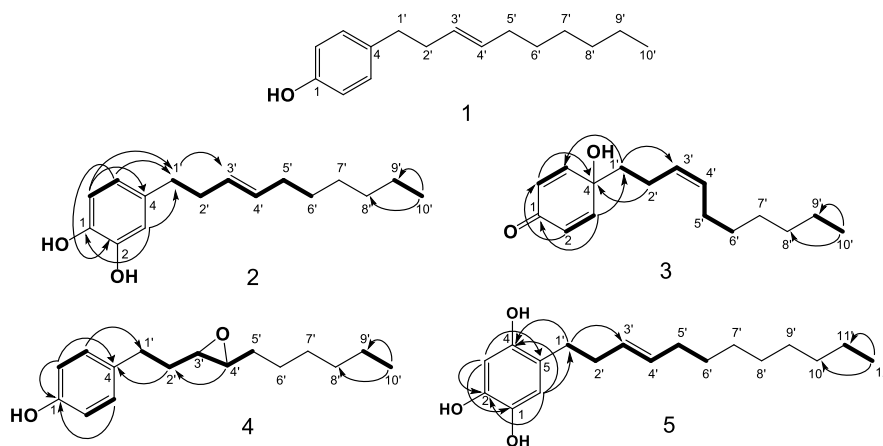
#### 3.3.1 Identificación estructural de los compuestos aislados

Del extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon* se aislaron nueve compuestos derivados de alquenilo, cuatro de ellos con núcleo de alquenilfenol, cuatro dímeros de alquenilfenol y un compuesto de tipo quinol sustituido en la posición cuatro con un grupo alquenilo. La estructura molecular de los compuestos aislados fue determinada por diferentes métodos espectroscópicos, principalmente IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , incluyendo experimentos APT, COSY, HMQC, HSQC, HMBC y espectrometría de masas de alta resolución HRESIMS (Anexo A – Figuras 5-1 a 5-43), así como la comparación de los datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.

El **compuesto 1** (Anexo A – Figuras 5-1 a 5-4) fue obtenido como un aceite incoloro e identificado completamente como gibbilimbol B<sup>5</sup>.

El **compuesto 2** (Anexo A – Figuras 5-5 a 5-8) fue obtenido como un aceite amarillo y su fórmula molecular fue establecida como  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$  basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a  $m/z$  247.1706  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. 247.1703). El espectro de

RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto 2 muestra claramente señales para un anillo aromático trisustituído  $\delta_{\text{H}}$  6.77 (1H, d,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , H-6), 6.71 (1H, s, H-3), 6.60 (1H, d,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ , H-5) y un fragmento de un grupo alqueno (Tabla 3-1). En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se pueden apreciar las mismas 10 señales del fragmento de alqueno que se ven en el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  para el gibbilimbol B, incluido el doble enlace en posición C-3' (Tabla 3-2), el cual fue confirmado por las correlaciones mostradas en los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-1). La configuración del doble enlace de la cadena alquílica fue asignada como *E*, de acuerdo a los valores de desplazamiento químico de los carbonos alílicos  $\delta_{\text{C}}$  34.6 (C-2') y  $\delta_{\text{C}}$  32.6 (C-5')<sup>8</sup>, comparándolos con los desplazamientos de los carbonos alílicos reportados para el análogo *E* conocido como gibbilimbol B [ $\delta_{\text{C}}$  34.6 (C-2') y  $\delta_{\text{C}}$  32.6 (C-5')], significativamente diferentes de los valores de desplazamiento químico de los carbonos alílicos reportados para el análogo *Z* climacostol [ $\delta_{\text{C}}$  33.2 (C-1') y  $\delta_{\text{C}}$  27.3 (C-4')]<sup>12</sup>. De esta forma, el compuesto 2 fue elucidado como (*E*)-4-(dec-3'-enil)bencen-1,2-diol y se le asignó el nombre común de eriopodol A.



**Figura 3-1:** Correlaciones COSY (negrilla) y HMBC (→) para los compuestos 2 a 5.

El **compuesto 3** (Anexo A – Figuras 5-9 a 5-12) fue obtenido como un aceite incoloro y su fórmula molecular fue establecida como  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$  basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a  $m/z$  247.1706  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. 247.1703). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto 3 también muestra las señales características del fragmento de alqueno y otras dos señales que integran para dos protones cada una en  $\delta_{\text{H}}$  6.11 (2H, d,  $J = 9.94 \text{ Hz}$ ) y 6.81 (2H, d,  $J = 9.96 \text{ Hz}$ ) (Tabla 3-1). El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto 3 muestra una señal característica de una cetona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada en  $\delta_{\text{C}}$  185.9, una señal de un carbono cuaternario oxigenado en  $\delta_{\text{C}}$  69.6 y las 10 señales características de la cadena lateral correspondiente al fragmento de alqueno (Tabla 3-2). Basados en las correlaciones

observadas en los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-1), la estructura del compuesto 3 fue determinada como un quinol sustituido en la posición 4 con un grupo alqueno con el doble enlace en la posición C-3'. La geometría del doble enlace para el compuesto 3 fue asignada como *Z*, comparando los desplazamientos de los carbonos alílicos  $\delta_c$  32.4 (C-2') y  $\delta_c$  26.6 (C-5') en la misma forma como se explicó anteriormente para el compuesto 2. Finalmente, el compuesto 3 fue elucidado como (*Z*)-4-(dec-3'-enil)-4-hidroxiciclohexa-2,5-dien-1-ona y se le asignó el nombre común de erioquinol.

**Tabla 3-1:** Desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) para los compuestos 1 a 4 ( $\text{CDCl}_3$ ) y 5 (MeOD).

Posición	$\delta\text{H}$ (J en Hz)				
	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-
2	6.75 (2H, d, J = 8.4)	-	6.11 (2H, d, J = 9.9)	6.76 (2H, d, J = 8.3)	-
3	7.04 (2H, d, J = 8.4)	6.71 (1H, s)	6.81 (2H, d, J = 9.9)	7.04 (2H, d, J = 8.3)	6.69 (1H, s)
4	-	-	-	-	-
5	7.04 (2H, d, J = 8.4)	6.60 (1H, d, J = 7.5)	6.81 (2H, d, J = 9.9)	7.04 (2H, d, J = 8.3)	-
6	6.75 (2H, d, J = 8.4)	6.77 (1H, d, J = 7.6)	6.11 (2H, d, J = 9.9)	6.76 (2H, d, J = 8.3)	6.51 (1H, s)
1'	2.60 (2H, t, J = 7.3)	2.54 (2H, t, J = 7.3)	1.77 (2H, m)	2.69 (2H, m)	2.26 (2H, m)
2'	2.26 (2H, m)	2.24 (2H, m)	1.93 (2H, m)	1.81 (2H, m)	2.04 (2H, m)
3'	5.42 (1H, brs)	5.42 (1H, brs)	5.34 (1H, m)	2.69 (1H, m)	5.26 (1H, brs)
4'	5.42 (1H, brs)	5.42 (1H, brs)	5.34 (1H, m)	2.69 (1H, m)	5.26 (1H, brs)
5'	1.97 (2H, m)	1.98 (2H, m)	1.93 (2H, m)	1.48 (2H, m)	1.91 (2H, m)
6'	1.26 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.23 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
7'	1.26 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.23 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
8'	1.26 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.23 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
9'	1.26 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.23 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
10'	0.89 (3H, t, J = 6.8)	0.89 (3H, t, J = 6.7)	0.85 (3H, t, J = 6.7)	0.88 (3H, t, J = 6.5)	1.29 (2H, m)
11'	-	-	-	-	1.29 (2H, m)
12'	-	-	-	-	0.89 (3H, t, J = 6.8)

El **compuesto 4** (Anexo A – Figuras 5-13 a 5-17) fue obtenido como un aceite amarillo y su fórmula molecular fue establecida como  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$  basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a  $m/z$  247.1715  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. 247.1703). Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  muestran casi las mismas señales que las observadas para el gibbilimbol B, pero sin la señal correspondiente a la insaturación de la cadena alquílica (Tablas 3-1 y 3-2). En su lugar, los carbonos C-3' y C-4' muestran desplazamientos químicos en  $\delta_c$  59.6 (C-3')  $\delta_c$  58.6 (C-4'), correspondientes a dos metinos oxigenados de un grupo epóxido, el cual fue confirmado por los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-1). Debido a que la señal correspondiente a los

hidrógenos de los metinos del epóxido se encontraba solapada con la señal del grupo metileno del carbono C-1' en  $\delta_H$  2.69 y no era posible establecer su multiplicidad ni su valor de constante de acoplamiento, se realizó el experimento J-Resolved (Anexo A-Figura 5-17), encontrando que el valor de la constante de acoplamiento entre los dos metinos del grupo epóxido era de 2.4 Hz ( $J_{H3'-H4'} = 2.4$  Hz), siendo consistente con una configuración relativa del tipo *trans* para epóxidos disustituídos<sup>13</sup>. Finalmente, la estructura del compuesto 4 fue elucidada como 4-(3'R\*,4'R\*-epoxidecenil)fenol y se le asignó el nombre común de eriopodol B.

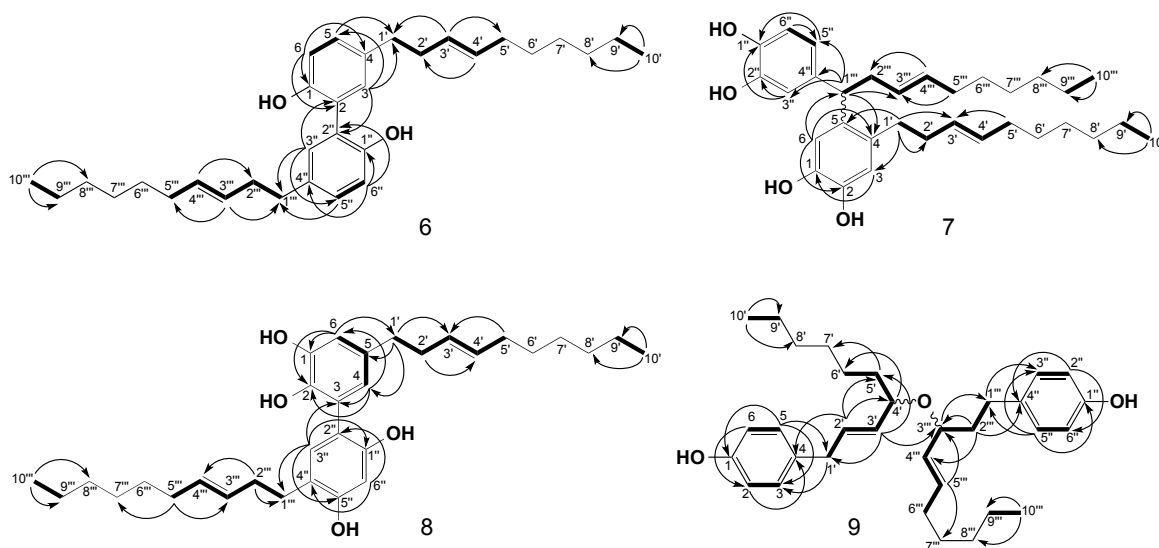
**Tabla 3-2:** Desplazamientos de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para los compuestos 1 a 4 (CDCl<sub>3</sub>) y 5 (MeOD).

Posición	$\delta C$ (ppm)				
	1	2	3	4	5
1	153.4	141.3	185.9	154.1	144.9
2	115.0	143.4	128.3	115.4	143.3
3	129.5	115.6	151.7	129.5	116.8
4	134.4	135.5	69.6	133.3	132.7
5	129.5	120.8	151.7	129.5	133.9
6	115.0	115.3	128.3	115.4	118.4
1'	35.2	35.4	39.5	31.5	35.1
2'	34.6	34.6	32.4	34.2	34.1
3'	129.2	129.3	127.9	59.6	131.0
4'	131.1	131.1	131.6	58.6	131.6
5'	32.5	32.6	26.6	32.1	33.5
6'	29.5	29.5	29.3	29.2	29.8
7'	28.8	28.8	28.7	26	30.6
8'	31.7	31.7	31.6	31.8	30.6
9'	22.6	22.6	22.5	22.6	32.8
10'	14.0	14.1	14.0	14.1	32.8
11'	-	-	-	-	23.6
12'	-	-	-	-	14.4

El **compuesto 5** (Anexo A – Figuras 5-18 a 5-21) fue obtenido como un sólido amorfo amarillo (m.p. 138.5 °C). Su fórmula molecular se estableció como C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> basada en su pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a m/z 291.1973 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. 291.1966). Los datos obtenidos en los experimentos RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C son muy similares a los obtenidos para el eriopodol A, pero en este caso el anillo aromático se encuentra tetra sustituido  $\delta_H$  6.51 (1H, s) y  $\delta_H$  6.69 (1H, s) y presenta un sustituyente alquenilo con una cadena de 12 carbonos (Tablas 3-1 y 3-2). El sistema de sustitución del anillo y la posición del doble enlace en la cadena lateral fueron confirmados por medio de los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-1),



mientras que la geometría del doble enlace fue asignada como *E*, al comparar los desplazamientos de los carbonos alílicos de la misma forma en que se hizo con los compuestos anteriores. La estructura del compuesto 5 fue elucidada como (*E*)-5-(dodec-3-enil)benceno-1,2,4-triol y se le asignó el nombre común de eriopodol C.



**Figura 3-2:** Correlaciones COSY (negrilla) y HMBC ( $\rightarrow$ ) para los compuestos 6 a 9.

El **compuesto 6** (Anexo A – Figuras 5-22 a 5-25) fue obtenido como un aceite anaranjado oscuro y su fórmula molecular fue establecida como  $C_{32}H_{46}O_2$  basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a  $m/z$  461.3431  $[M-H]^-$  (calcd. 461.3435). Las señales obtenidas en los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  son características de alquenilfenoles, muy similares a las de los compuestos discutidos anteriormente. En el espectro de RMN  $^1H$  se aprecian tres señales aromáticas características de un anillo aromático trisustituído  $\delta_H$  6.93 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.07 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 7.11 (1H, dd,  $J = 8.2, 2.1$  Hz) y un fragmento de un grupo alquenilo (Tabla 3-3). En el espectro de RMN  $^{13}C$  se pueden apreciar 8 señales entre  $\delta_C$  116 y  $\delta_C$  152 ppm, de las cuales, 6 corresponden a los carbonos del anillo aromático y 2 a los carbonos del doble enlace de la cadena alquílica, con el mismo patrón que siguen los espectros de RMN  $^{13}C$  para los compuestos 1 y 2 (Tabla 3-4). Por medio de los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-2) se confirmó la posición del doble enlace en el carbono C-3' y su configuración fue asignada como *E*, teniendo en cuenta el desplazamiento químico que mostraron los carbonos alílicos  $\delta_C$  34.7 (C-2') y  $\delta_C$  32.7 (C-5'), tal y como se explicó anteriormente. De acuerdo a la fórmula molecular del compuesto 6 y a las características de las señales mostradas en los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$ , HMBC y COSY, se pudo establecer que

el compuesto 6 corresponde a un dímero de alquencilfenol simétrico, en el que los dos monómeros fueron determinados como dos unidades de (*E*)-4-(dec-3'-enil)fenol con unión de tipo bifenilo, a través de los carbonos C-2 y C-2'' de los anillos aromáticos. Tanto el tipo de sustitución de los anillos aromáticos como la unión entre ellos fueron determinadas y confirmadas basadas en las correlaciones mostradas en el experimento HMBC entre H-3 y C2'', las mismas que entre H-3'' y C-2' (Figura 3-2). De esta forma, el compuesto 6 fue elucidado como un dímero de alquilfenol y se le asignó el nombre común de eriopodol D.

**Tabla 3-3:** Desplazamientos de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para los compuestos 6 a 9 (CDCl<sub>3</sub>).

Posición	$\delta$ H (J en Hz)			
	6	7	8	9
2	-	-	-	6.76 (2H, d, J =8.4)
3	7.07 (1H, d, J =2.0)	6.59 (1H, m)	-	7.05 (2H, d, J =8.4)
4	-	-	6.45 (1H, d, J=2.0)	-
5	7.11 (1H, dd, J =8.2, 2.0)	-	-	7.05 (2H, d, J =8.4)
6	6.93 (1H, d, J =8.2)	6.56 (1H, m)	6.74 (1H, d, J=2.0)	6.76 (2H, d, J =8.4)
1'	2.65 (2H, m)	3.91 (1H, t, J=7.3)	2.55 (2H, m)	3.30 (2H, d, J =6.6)
2'	2.30 (2H, m)	2.36 (1Ha, m) 2.40 (1Hb, m)	2.25 (1H, m)	5.77 (1H, m)
3'	5.44 (1H, m)	5.21 (1H, m)	5.42 (1H, m)	5.51 (1H, m)
4'	5.44 (1H, m)	5.33 (1H, m)	5.42 (1H, m)	4.10 (1H, m)
5'	1.98 (2H, m)	1.86 (2H, m)	1.95 (2H, m)	1.51 (1Ha, m) 1.57 (1Hb, m)
6'	1.28 (2H, m)	1.23 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
7'	1.28 (2H, m)	1.20 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
8'	1.29 (2H, m)	1.19 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
9'	1.29 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
10'	0.88 (3H, t, J = 6,8)	0.87 (3H, m)	0.87 (3H, m)	0.88 (3H,m))
2''	-	-	-	6.75 (2H, d, J =8.4)
3''	7.07 (1H, d, J =2.0)	6.67 (1H, m)	6.83 (1H, s)	7.03 (2H, d, J =8.4)
5''	7.11 (1H, dd, J =8.2, 2.0)	6.57 (1H, d, J = 8.1 Hz)	-	7.03 (2H, d, J =8.4)
6''	6.93 (1H, d, J =8.2)	6.67 (1H, m)	6.68 (1H, s)	6.75 (2H, d, J =8.4)
1'''	2.65 (2H, m)	2.41 (1Ha, m) 2.54 (1Hb, m)	2.38 (2H, m)	2.60 (2H, m)
2'''	2.30 (2H, m)	2.08 (2H, m)	2.06 (2H, m)	1.79 (1Ha, m) 1.85 (1Hb, m)
3'''	5.44 (1H, m)	5.39 (1H, m)	5.23 (1H, m)	4.07 (1H, m)
4'''	5.44 (1H, m)	5.39 (1H, m)	5.25 (1H, m)	5.48 (1H, m)
5'''	1.98 (2H, m)	1.96 (2H, m)	1.88 (2H, m)	5.65 (1H, m)
6'''	1.28 (2H, m)	1.31 (2H, m)	1.27 (2H, m)	2.03 (2H, m)
7'''	1.28 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.36 (2H, m)
8'''	1.29 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
9'''	1.29 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.27 (2H, m)	1.29 (2H, m)
10'''	0.88 (3H, t, J = 6.8)	0.87 (3H, m)	0.87 (3H, m)	0.88 (3H,m)

El **compuesto 7** (Anexo A – Figuras 5-26 a 5-31) fue obtenido como un aceite amarillo oscuro y su fórmula molecular fue establecida como  $C_{32}H_{46}O_4$  basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a  $m/z$  493.3318  $[M-H]^-$  (calcd. 493.3323). El espectro RMN  $^1H$  para el compuesto 7 muestra dos singletes en la región aromática en  $\delta_H$  6.56 (3H, brs) y 6.64 (2H, brs), dos señales correspondientes a protones vinílicos en  $\delta_H$  5.38 (2H, brs) y 5.25 (2H, m), un triplete en  $\delta_H$  3.91 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz) y distintas señales de protones alifáticos en la región de  $\delta_H$  0.7 a 2.6 ppm (Tabla 3-3). En el espectro de RMN  $^{13}C$  se pueden apreciar 16 señales entre  $\delta_C$  113 y  $\delta_C$  145 ppm, de las cuales, 12 corresponden a los carbonos de dos anillos aromáticos y 4 a los carbonos de los grupos metino de dos dobles enlaces, así como otras 16 señales entre  $\delta_C$  14 y  $\delta_C$  45 ppm características de los carbonos alifáticos de los grupos metileno y metilo de dos cadenas laterales de alquenilfenoles (Tabla 3-4). De acuerdo a la fórmula molecular del compuesto 7 y a las señales mostradas en los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$ , APT, HSQC y HMBC (Anexo A – Figuras 5-26 a 5-29) se pudo determinar que el compuesto 7 es un dímero de alquenilfenol, con la unión de los dos monómeros a través de los carbonos C-5 y C-1'', establecida a través de las correlaciones entre los protones en H-2''-C-5 y H2''-C4'' (Figura 3-2). La posición de los dobles enlaces en las cadenas laterales fue establecida por medio de las correlaciones mostradas en el experimento HMBC en los carbonos C-3' y C-3'' en cada una de las cadenas. De acuerdo al desplazamiento de los carbonos alílicos en  $\delta_C$  34.6 (C-2') y  $\delta_C$  32.7 (C-5') para una de las cadenas, se pudo establecer como *E* la geometría de uno de los dobles enlaces, mientras que para establecer la geometría del doble enlace de la cadena lateral del otro monómero, se realizó el experimento J-Resolved (Anexo A-Figura 5-30), encontrando que la constante de acoplamiento entre los metinos del doble enlace ubicados en la posición C-3'' tenían un valor de 15.0 Hz ( $J_{H3''-H4''} = 15.0$  Hz), siendo consistente con una configuración de tipo *E*. Finalmente, la asignación de las dos cadenas alifáticas fue confirmada de forma independiente por medio de diferentes experimentos TOCSY selectivos, realizados sobre las señales en  $\delta_H$  3.91 (H-1''') y en  $\delta_H$  2.54 (H-1') (Anexo A-Figuras 5-30 y 5-31) a través de los cuales se confirmó la secuencia de protones y dobles enlaces para cada una de las dos cadenas laterales de los alquenilfenoles de forma independiente. De esta forma, se pudo establecer que el compuesto 7 corresponde a un dímero de alquenilfenol, en el que los dos monómeros fueron determinados como dos unidades de (*E*)-4-(dec-3'-enil)bencen-1,2-diol y se le asignó el nombre común de eriopodol E.

**Tabla 3-4:** Desplazamientos de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para los compuestos 6 a 9 (CDCl<sub>3</sub>).

Posición	$\delta C$ (ppm)			
	6	7	8	9
1	151.0	141.2	143.7	153.6
2	123.8	141.4	138.1	115.2
3	131.2	116.9	127.8	129.5
4	135.4	135.6	121.9	132.2
5	129.9	133.3	134.8	129.5
6	116.6	115.5	114.7	115.2
1'	35.4	32.5	35.7	37.7
2'	34.8	34.5	34.7	130.8
3'	129.3	129.5	129.4	134.1
4'	131.5	131.2	131.3	73,0
5'	32.8	32.7	32.7	37.3
6'	29.7	29.7	31.9	25.4
7'	28.9	29.0	29.6	29.1
8'	31.9	31.9	31.8	31.8
9'	22.8	22.7	22.7	22.5
10'	14.2	14.2	14.2	14.1
1''	151.0	141.6	141.7	153.9
2''	123.8	143.4	127.1	115.1
3''	131.2	115.0	116.8	129.6
4''	135.4	138.4	134.6	134.1
5''	129.9	121.1	143.8	129.6
6''	116.6	115.1	117.4	115.1
1'''	35.4	45.4	32.6	30.8
2'''	34.8	39.7	34.2	39.0
3'''	129.3	128.2	129.1	72.5
4'''	131.5	132.5	131.5	132.6
5'''	32.8	32.7	32.7	132.7
6'''	29.7	29.5	31.8	32.1
7'''	28.9	28.9	29.7	28.8
8'''	31.9	31.8	31.7	31.3
9'''	22.8	22.7	22.7	22.5
10'''	14.2	14.2	14.2	14.2

El **compuesto 8** (Anexo A-Figuras 5-32 a 5-37) fue obtenido como un aceite anaranjado oscuro y su fórmula molecular fue establecida como C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub> basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a m/z 493.3319 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. 493.3323). El espectro RMN <sup>1</sup>H para el compuesto 8 muestra cuatro señales en la región aromática que indican la presencia de dos anillos aromáticos tetrasustituídos, uno de ellos con dos protones en posición para  $\delta_H$  6.69 (1H, s) y 6.85 (1H, s) y el otro con dos protones en posición meta  $\delta_H$

6.45 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 6.74 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz); dos señales correspondientes a protones vinílicos en  $\delta_H$  5.41 (2H, m) y 5.24 (2H, m) y distintas señales de protones alifáticos en la región de  $\delta_H$  0.7 a 2.6 ppm (Tabla 3-3). En el espectro de RMN  $^{13}C$  se pueden apreciar 32 señales muy similares a las mostradas anteriormente para el compuesto 7, 16 señales entre  $\delta_C$  113 y  $\delta_C$  145 ppm y otras 16 señales entre  $\delta_C$  14 y  $\delta_C$  45 ppm, indicando la presencia de un dímero de alquenilfenol (Tabla 3-4). El tipo de sustitución de los anillos aromáticos, la posición de los dobles enlaces y la unión de los dos monómeros fueron determinadas a través de las correlaciones mostradas en los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-2), confirmando una unión de tipo bifenilo, a través de los carbonos C-3 y C-2'' de los anillos aromáticos y la posición de los dobles enlaces en los carbonos C-3' y C-3'''. La geometría del doble enlace fue asignada como *E*, al comparar los desplazamientos de los carbonos alílicos de cada una de las cadenas laterales, de la misma forma en que se hizo con los compuestos anteriores y confirmada por medio del experimento J-Resolved (Anexo A-Figura 5-36). La asignación de las dos cadenas laterales de los anillos aromáticos fue confirmada de forma independiente, por medio de diferentes experimentos TOCSY-selectivos realizados sobre las señales en  $\delta_H$  5.25 (H-3''') y  $\delta_H$  5.42 (H-3') (Anexo A-Figuras 5-36 y 5-37), confirmando la secuencia de protones y dobles enlaces para cada una de las dos cadenas laterales. De esta forma, se pudo establecer que el compuesto 8 corresponde a un dímero de alquenilfenol, en el que los dos monómeros fueron determinados como (*E*)-4-(dec-3'-enil)bencen-1,2-diol y (*E*)-2-(dec-3'-enil)bencen-1,5-diol y posteriormente se le asignó el nombre común de eriopodol F.

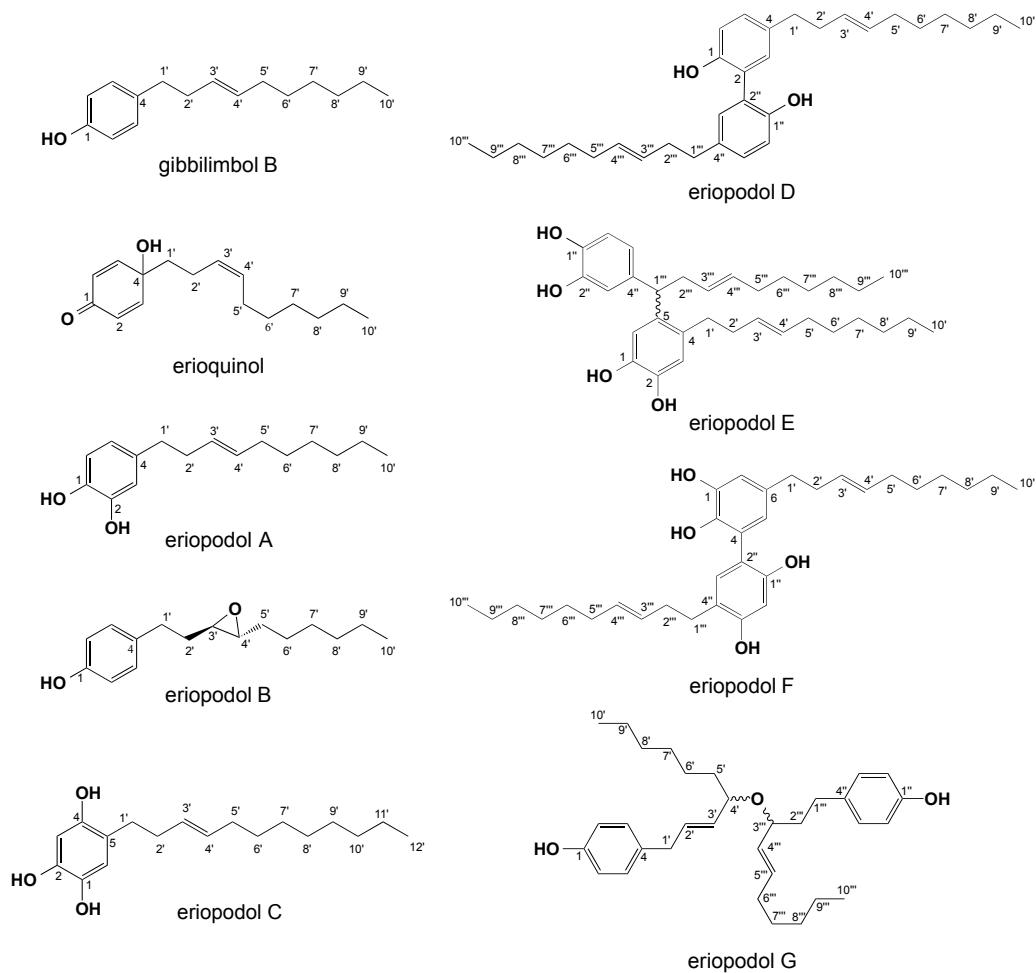
El **compuesto 9** (Anexo A-Figuras 5-38 a 5-43) fue obtenido como un aceite anaranjado y su fórmula molecular fue establecida como  $C_{32}H_{46}O_3$  basada en el pico de ion pseudomolecular obtenido en el espectro HRESIMS a  $m/z$  477.3374 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. 477.3374). El espectro RMN  $^1H$  para el compuesto 9 muestra cuatro señales en la región aromática  $\delta_H$  6.75 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.76 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.05 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz) y 7.06 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), que indican la presencia de dos anillos aromáticos para-disustituídos. También se observan cuatro señales en  $\delta_H$  5.48 (1H, m), 5.51 (1H, m), 5.65 (1H, m) y 5.77 (1H, m) que corresponden a protones vinílicos de dos dobles enlaces, junto con dos señales en  $\delta_H$  4.07 (1H, m) y  $\delta_H$  4.10 (1H, m) características de dos grupos metinos oxigenados y distintas señales de protones alifáticos en la región de  $\delta_H$  0.7 a 3.5 ppm (Tabla 3-3). En el espectro de RMN  $^{13}C$  se pueden apreciar 32 señales, similares a las mostradas anteriormente para los dímeros de alquenilfenol, 16 de ellas entre  $\delta_C$  115 y  $\delta_C$  155 ppm correspondientes a los dos anillos aromáticos y a los dobles enlaces

de las cadenas laterales, dos señales en  $\delta_c$  73.0 y  $\delta_c$  72.5 correspondientes a carbonos oxigenados y otras 14 señales entre  $\delta_c$  14 y  $\delta_c$  40, confirmando la presencia de un dímero de alquenilfenol (Tabla 3-4). Basados en las correlaciones observadas en los experimentos COSY y HMBC (Figura 3-2), se pudo establecer que los dobles enlaces de las cadenas laterales se encontraban en las posiciones C-2' y C-4'''; y que los dos monómeros se encontraban unidos a través de un puente de oxígeno entre los carbonos C-4' y C-3''', sin embargo, la configuración de dichos carbonos aún está pendiente por definir. Para poder determinar el tipo de geometría de los dobles enlaces y confirmar la secuencia de las cadenas de los monómeros de forma independiente, se realizaron diferentes experimentos TOCSY selectivos, sobre las señales en  $\delta_H$  5.65 (H-5''') y en  $\delta_H$  5.77 (H-2') (Anexo A-Figuras 5-42 y 5-43) a través de los cuales se pudo determinar el valor para las constantes de acoplamiento de los protones H-3'  $\delta_H$  5.54 (1H, dd,  $J = 15.3, 6.9$  Hz) y H-4'''  $\delta_H$  5.48 (1H, dd,  $J = 15.3, 7.0$  Hz), encontrando que dichos protones presentaban una geometría de sustitución de tipo *E*. Esta misma geometría fue confirmada por medio del experimento J-Resolved (Anexo A-Figura 5-42). Finalmente, se pudo establecer que el compuesto 9 es un dímero de alquenilfenol formado por los monómeros (*E*)-4-(dec-2'-enil)fenol y (*E*)-4-(dec-4'-enil)fenol y posteriormente se le asignó el nombre de eriopodol G.

De forma general, del extracto etanólico de las hojas de *P. eriopodon*, se aislaron 9 compuestos derivados de alquenilfenoles, de los cuales, 8 de ellos no presentan reportes previos en la literatura y se reportan por primera vez en este trabajo. En particular, el compuesto 3 corresponde a un nuevo quinol sustituido con un grupo alquenilo, por lo que se le asignó el nombre común de erioquinol; los compuestos 2, 4 y 5 corresponden a nuevos alquenilfenoles eriopodoles A-C respectivamente y los otros cuatro compuestos corresponden a nuevos dímeros de alquenilfenol eriopodoles D-G (Figura 3-3). El compuesto 1 que fue identificado como gibbilimbol B, presenta reportes previos de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de nasofaringe (ED<sub>50</sub> de 3.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y fue aislado por primera vez de la planta medicinal *P. gibbilimum*, utilizada en la medicina tradicional de Papua Nueva Guinea para tratar diferentes tipos de cáncer<sup>3,5</sup> y más recientemente de la especie vegetal *P. malacophyllum*<sup>14</sup> donde mostró tener potente actividad leishmanicida.

Dentro del género *Piper*, se ha reportado ampliamente la presencia de distintos alquenilfenoles con diferentes propiedades biológicas, principalmente actividad antibacteriana, antiparasitaria, anti-inflamatoria y citotóxica<sup>5,8,14-16</sup>. Estos alquenilfenoles, se caracterizan por poseer una estructura química simple a partir de bencenos hidroxilados y sustituidos con cadenas

alquílicas laterales de diferentes longitudes, que poseen al menos un doble enlace. Por otro lado, los quinoles son compuestos derivados del núcleo 4-hidroxiciclohexa-2,5-dien-1-ona con algunos reportes en la naturaleza<sup>17,18</sup>. Una característica importante de los quinoles sustituidos en la posición 4 con grupos arilo, es que representan una clase de potentes agentes antitumorales frente diferentes líneas celulares<sup>19-22</sup>.

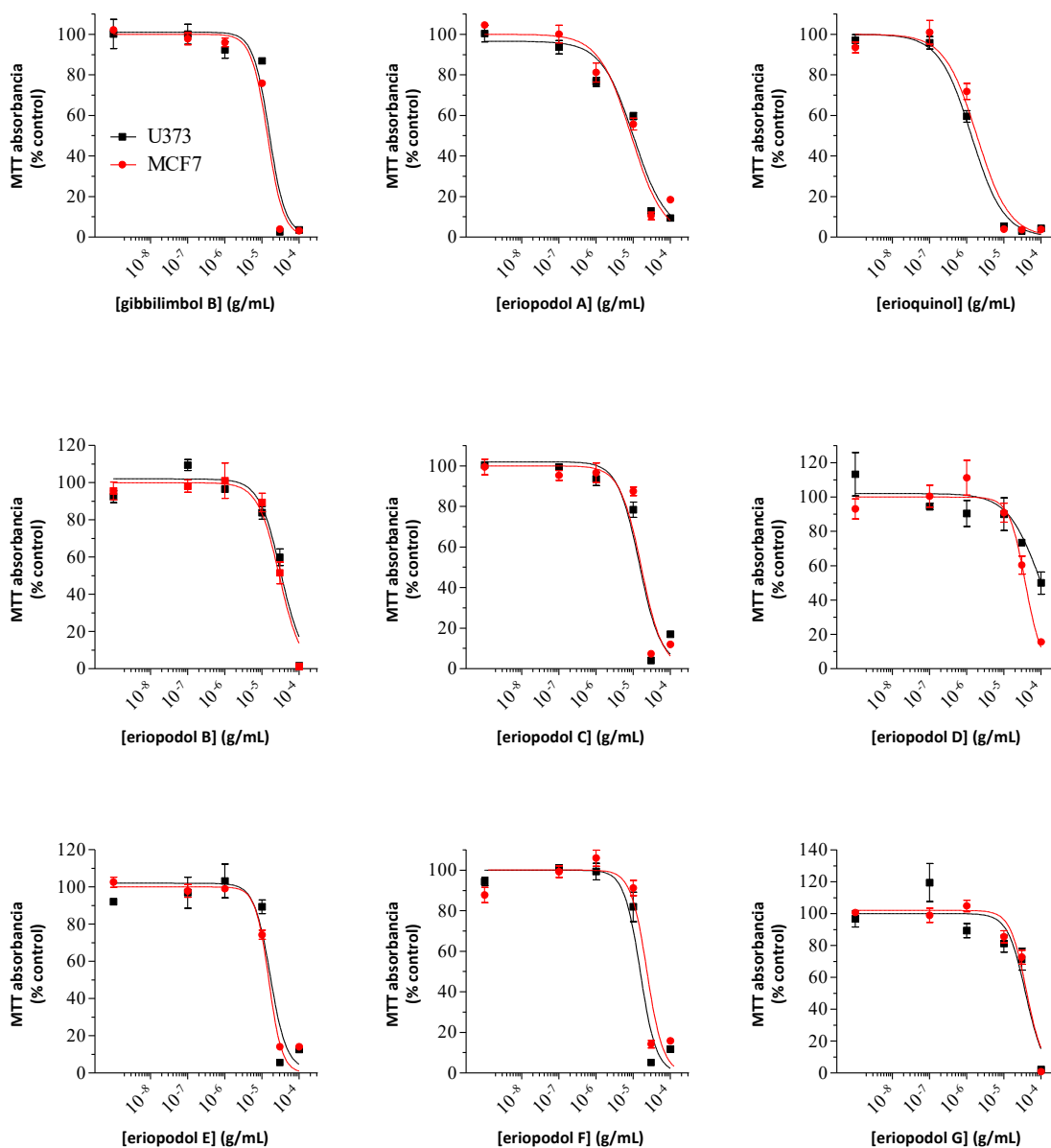


**Figura 3-3:** Compuestos derivados de alquenilfenol, aislados del extracto etanólico de las hojas de *P. eriopodon*.

### 3.3.2 Determinación de la Actividad Citotóxica de los compuestos aislados en líneas celulares de cáncer humano

Con el fin de determinar el potencial antitumoral de los nueve compuestos, se decidió evaluar la actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer humano MCF7 (mama) y U373 (glioblastoma), ampliamente utilizadas como modelos *in vitro* adecuados para la investigación en cáncer. El gibbilimbol B se usó como compuesto de referencia, debido a que su efecto

citotóxico ya ha sido reportado en diferentes líneas tumorales<sup>5,23</sup>. Los ensayos de viabilidad celular se evaluaron por medio del ensayo de reducción del MTT a un tiempo de 24h, utilizando diferentes tratamientos con los compuestos aislados y posteriormente se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria 50) por medio de una curva dosis-respuesta para cada uno de los compuestos evaluados (Figura 3-4).



**Figura 3-4:** Efecto citotóxico de los compuestos aislados de las hojas de *P. eriopodon* en líneas celulares de cáncer humano U373 y MCF7. Las líneas celulares fueron tratadas por 24 h con diferentes



concentraciones (100, 30, 10, 1.0 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) de los compuestos gibbilimbol B, erioquinol y eriopodoles A-G, antes de realizar el ensayo del MTT.

Como se observa en la figura 3-4, tanto los alquenilfenoles como los dímeros de alquenilfenol aislados de la especie vegetal *P. eriopodon* mostraron tener efectos de inhibición del crecimiento celular dependientes de la concentración para las dos líneas celulares evaluadas, con valores de  $\text{IC}_{50}$  en un rango de 1.78 a 40.14  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 3-5). Los compuestos que presentaron el mayor potencial citotóxico frente a las dos líneas celulares fueron erioquinol, eriopodol, gibbilimbol B y eriopodol C, mientras que los demás alquenilfenoles y dímeros de alquenilfenol mostraron tener una actividad moderada frente a las líneas celulares evaluadas. De forma particular, el eriopodol D mostró tener un efecto citotóxico casi tres veces más potente frente a la línea celular MCF7 ( $\text{IC}_{50} = 37.98 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con la línea celular U373 ( $\text{IC}_{50} = 93.32 \mu\text{g/mL}$ ), mostrando cierta selectividad hacia la línea celular de cáncer de mama.

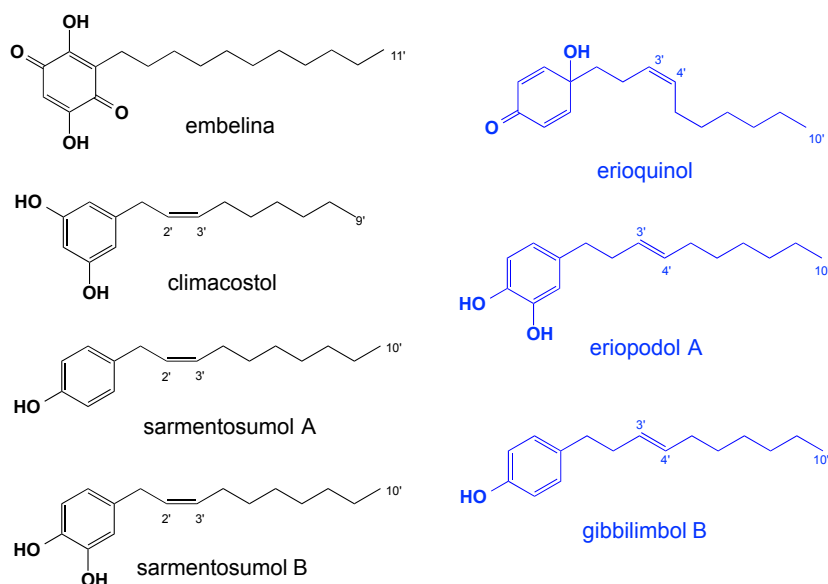
**Tabla 3-5:** Potencial citotóxico de los compuestos gibbilimbol B, erioquinol y eriopodoles A-G frente a líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama).

Compuesto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>Glioblastoma U373</i>	<i>Mama MCF7</i>
Gibbilimbol B	16.79	16.44
Eriopodol A	11.12	10.12
Erioquinol	1.78	2.63
Eriopodol B	31.91	29.36
Eriopodol C	14.30	16.30
Eriopodol D	93.32	37.98
Eriopodol E	15.04	17.63
Eriopodol F	14.90	20.58
Eriopodol G	38.58	40.14

Una característica común de los compuestos que mostraron el mayor efecto citotóxico, es la presencia de un doble enlace en la posición C-3' de la cadena lateral. Si comparamos la actividad citotóxica mostrada por el reemplazo de un grupo epóxido (eriopodol B) en lugar del doble enlace (gibbilimbol B); es evidente que la presencia del doble enlace en la cadena lateral parece incrementar el efecto citotóxico frente a las líneas tumorales MCF7 y U373. Interesantemente, aún más que la presencia del doble enlace, es la posición y la geometría del mismo en el carbono C-3' de la cadena lateral, siendo esta una característica determinante para la actividad citotóxica, debido a que se han reportado algunos alquenilfenoles similares como

los sarmentosumoles A y B (Figura 3-5), pero con el doble enlace con geometría (*Z*) en la posición C-2' de la cadena lateral y sin poseer en estos casos ningún efecto citotóxico en líneas celulares tumorales como K562 (leucemia) y A549 (pulmón)<sup>8</sup>.

Otro compuesto estructuralmente similar a los reportados en este trabajo y ampliamente reportado como un potente agente antitumoral y proapoptótico en distintos tipos de cáncer es el climacostol. Este alquenilfenol, al igual que el eriopodol A reportado en este trabajo, se caracteriza por tener en su estructura química un benceno dihidroxilado con una cadena lateral de 9 átomos de carbono y una insaturación en C-2' con geometría (*Z*), pero con un patrón de sustitución diferente sobre el anillo aromático de los grupos hidroxilo (Figura 3-5).



**Figura 3-5:** Comparación estructural de algunos alquenilfenoles y alquilquinoas con actividad citotóxica (embelina, climacostol, erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B) y sin actividad citotóxica (sarmentosumoles A y B) en líneas celulares de cáncer.

De los 9 compuestos aislados del extracto etanólico de las hojas de *P. eriopodon*, el compuesto que presentó el mayor efecto citotóxico frente las líneas celulares evaluadas fue el erioquinol. Aunque el erioquinol no es propiamente un alquenilfenol, es interesante ver que, al igual que los otros compuestos aislados que mostraron tener efecto citotóxico, el erioquinol posee también una cadena alquímica de 10 átomos de carbono, con una insaturación en la posición C-3'. Adicionalmente, es importante resaltar que quinoles similares sustituidos en la posición 4, con grupos arilo en lugar de alquilo, han sido reportados previamente como una clase de potentes agentes antitumorales frente a diferentes líneas celulares de cáncer renal, colon y

mama<sup>19-22</sup>. Particularmente se han reportado otros compuestos naturales con actividad antitumoral como la embelina que, en efecto, comparte ciertas características estructurales con el erioquinol. La embelina, aislada de la planta medicinal *Embelia ribes*, es una alquilquinona que posee una cadena alquílica lateral de 11 átomos de carbono sin insaturaciones (Figura 3-5) y ha sido reportada ampliamente como un potente agente antitumoral en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*<sup>24</sup>. Es evidente que tanto la cadena alquílica, como la posición del doble enlace y el tipo de sustitución del anillo aromático juegan un papel fundamental en la presencia o ausencia de actividad citotóxica, sin embargo, para poder establecer de forma directa una relación completa estructura-actividad es necesario llevar a cabo otros trabajos adicionales con la ayuda de metodologías computacionales que tal vez, permitirán establecer un modelo adecuado que reúna las características estructurales más importantes de cada uno de los compuestos activos.

Finalmente, basados en los resultados de actividad citotóxica obtenidos para los 9 compuestos aislados, se decidió continuar el trabajo con los tres compuestos que presentaron el mayor potencial citotóxico, con el fin de poder establecer una aproximación al mecanismo de muerte celular inducido por estos compuestos y determinar la participación de algunas proteínas involucradas en los procesos de muerte celular.

### 3.4 Conclusiones

De las fracciones activas del extracto etanólico de las hojas de *P. eriopodon*, se realizó el aislamiento de nueve compuestos que mostraron tener efectos citotóxicos en las líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama). Todos los compuestos aislados son alquenilfenoles que comparten características estructurales similares, principalmente la presencia de núcleos fenólicos con diferente patrón de sustitución y cadenas alquílicas con una instauración de tipo *E* o *Z* en la posición C-3', correspondiendo los nueve compuestos aislados a los alquenilfenoles gibbilimbol B, eriopodoles A-G y un quinol sustituido en la posición 4 con una cadena alquílica denominado erioquinol.

De los nueve compuestos aislados de *P. eriopodon*, ocho de ellos se reportan por primera vez en este trabajo, generando un nuevo aporte a nivel fitoquímico y quimiotaxonómico, debido a que *P. eriopodon* corresponde a la segunda especie vegetal del género *Piper* en la que se reporta la presencia de dímeros de alquenilfenol.

Los compuestos con el mayor potencial citotóxico frente a las líneas celulares de cáncer U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama) fueron erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B/eriopodol C con valores de IC<sub>50</sub> en un rango entre 1.78 y 16.79 µg/mL. Por esta razón, se seleccionaron los compuestos erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B para realizar un estudio de los posibles mecanismos de muerte desencadenados por estos compuestos en líneas celulares tumorales.

### 3.5 Bibliografía

- (1) Mgbeahuruike, E. E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H.; Holm, Y. Bioactive Compounds from Medicinal Plants: Focus on *Piper* Species. *South African J. Bot.* **2017**, *112*, 54–69.
- (2) Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; et al. Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*. **1997**, *46* (4), 597-673.
- (3) Salehi, B.; Zakaria, Z. A.; Gyawali, R.; Ibrahim, S. A.; Rajkovic, J.; Shinwari, Z. K.; Khan, T.; Sharifi-Rad, J.; Ozleyen, A.; Turkdonmez, E.; et al. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules* **2019**, *24* (1364), 1–118.
- (4) Wang, Y.-H.; Lee, K.-H.; Long, C.-L.; Morris-Natschke, S.; Niu, H.-M.; Yang, J. Anticancer Principles from Medicinal *Piper* Plants. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4* (1), 8–16.
- (5) Orjala, J.; Mian, P.; Rali, T.; Sticher, O. Gibbilimbols A-D, Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilimum*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (7), 939–941.
- (6) Bezerra, D. P.; Pessoa, C.; De Moraes, M. O.; Saker-Neto, N.; Silveira, E. R.; Costa-Lotufo, L. V. Overview of the Therapeutic Potential of Piplartine (Piperlongumine). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 453–463.
- (7) Cortez, A. P.; De Ávila, R. I.; Da Cunha, C. R. M.; Santos, A. P.; Menegatti, R.; Rezende, K. R.; Valadares, M. C. 4-Nerolidylcatechol Analogues as Promising Anticancer Agents. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *765*, 517–524.
- (8) Yang, S.; Sun, Q.; Yang, F.; Hu, G.; Luo, J.; Wang, Y. Sarmentosumols A to F, New Mono- and Dimeric Alkenylphenols from *Piper sarmentosum*. *Planta Med.* **2013**, *5* (79), 693–697.
- (9) Gundala, S. R.; Yang, C.; Mukkavilli, R.; Paranjpe, R.; Brahmabhatt, M.; Pannu, V.; Cheng, A.; Reid, M. D.; Aneja, R. Hydroxychavicol, a Betel Leaf Component, Inhibits Prostate Cancer through ROS-Driven DNA Damage and Apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *280*, 86–96.

- (10) Correa, Y.; Palomino, Lady; Marino, O. Actividad Antioxidante y Antifúngica de Piperaceas de La Flora Colombiana. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2015**, *20* (2).
- (11) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- (12) Masaki, M. E.; Hiro, S.; Usuki, Y.; Harumoto, T.; Terazima, M. N.; Buonanno, F.; Miyake, A.; Iio, H. Climacostol, a Defense Toxin of *Climacostomum virens* (Protozoa, Ciliata), and Its Congeners. *Tetrahedron* **2004**, No. 60, 7041–7048.
- (13) Zhang, X.; Zhang, X.; Wang, Y.; Chen, F.; Li, Y.; Li, Y.; Tan, Y.; Gong, J.; Zhong, X.; Li, H.; et al. A New Diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* Promotes the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Nat. Prod. Res.* **2018**.
- (14) Oliveira, A. De; Mesquita, J. T.; Tempone, A. G.; Henrique, J.; Lago, G.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J. Leishmanicidal Activity of an Alkenylphenol from *Piper malacophyllum* Is Related to Plasma Membrane Disruption. *Exp. Parasitol.* **2012**, *132* (3), 383–387.
- (15) Yoshida, N. C.; Benedetti, A. M.; dos Santos, R. A.; Ramos, C. S.; Batista, R.; Yamaguchi, L. F.; Kato, M. J. Alkenylphenols from *Piper dilatatum* and *P. diospyrifolium*. *Phytochem. Lett.* **2018**, *25* (April), 136–140.
- (16) Valdivia, C.; Marquez, N.; Eriksson, J.; Vilaseca, A.; Muñoz, E.; Sterner, O. Bioactive Alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16* (7), 4120–4126.
- (17) Freitas, G. C.; Batista Jr., J. M.; Franchi Jr., G. C.; Nowill, A. E.; Yamaguchi, L. F.; Vilcachagua, J. D.; Favaro, D. C.; Furlan, M.; Guimarães, E. F.; Jeffrey, C. S.; et al. Cytotoxic Non-Aromatic B-Ring Flavanones from *Piper carniconnectivum* C. DC. *Phytochemistry* **2014**, *97* (0), 81–87.
- (18) Nishino, C.; Kobayashi, K.; Fukushima, M. Halleridone, a Cytotoxic Constituent from *Cornus controversa*. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51* (6), 1281–1282.
- (19) Bradshaw, T. D.; Matthews, C. S.; Cookson, J.; Chew, E.; Shah, M.; Bailey, K.; Monks, A.; Harris, E.; Westwell, A. D.; Wells, G.; et al. Elucidation of Thioredoxin as a Molecular Target for Antitumor Quinols. **2005**, No. 9, 3911–3920.
- (20) Berry, J. M.; Bradshaw, T. D.; Fichtner, I.; Ren, R.; Schwalbe, C. H.; Wells, G.; Chew, E.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. Quinols as Novel Therapeutic Agents. 2. 4-(1-Arylsulfonylindol-2-yl)-4-Hydroxycyclohexa-2,5-Dien-1-Ones and Related Agents as Potent and Selective Antitumor Agents. **2005**, 639–644.
- (21) McCarroll, A. J.; Bradshaw, T. D.; Westwell, A. D.; Matthews, C. S.; Stevens, M. F. G. Quinols

- As Novel Therapeutic Agents. 7. 1 Synthesis of Antitumor 4-[1-(Arylsulfonyl-1H-Indol-2-Yl)]-4-Hydroxycyclohexa-2,5-Dien-1-Ones by Sonogashira Reactions. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (7), 1707–1710.
- (22) Wells, G.; Berry, J. M.; Bradshaw, T. D.; Burger, A. M.; Seaton, A.; Wang, B.; Westwell, A. D.; Stevens, M. F. G. 4-Substituted 4-Hydroxycyclohexa-2,5-Dien-1-Ones with Selective Activities against Colon and Renal Cancer Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (4), 532–541.
- (23) Muñoz, D.; Sandoval-Hernandez, A.; Delgado, W.; Arboleda, G.; Cuca, L. In Vitro Anticancer Screening of Colombian Plants from *Piper* Genus (Piperaceae). *J. Pharmacogn. Phyther.* **2018**, *10* (9), 174–181.
- (24) Prabhu, K. S.; Achkar, I. W.; Kuttikrishnan, S.; Akhtar, S.; Khan, A. Q.; Siveen, K. S.; Uddin, S. Embelin: A Benzoquinone Possesses Therapeutic Potential for the Treatment of Human Cancer. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (8), 961–976.

# **4. Capítulo 4: Muerte celular inducida en líneas celulares de cáncer humano por los compuestos aislados de *P. eriopodon***

## **4.1 Introducción**

La selección evolutiva y los diferentes mecanismos químicos de defensa de las plantas, han permitido que los productos naturales posean una enorme variedad química estructural con diversas propiedades biológicas, que no puede ser igualada por ninguna biblioteca de compuestos sintéticos y en los últimos años continúan inspirando nuevos descubrimientos en química, biología y medicina<sup>1,2</sup>. Los compuestos fenólicos, por ejemplo, son algunos de los productos naturales que más han llamado la atención de los investigadores, debido a su gran potencial como agentes antioxidantes, antibacteriales y antitumorales, convirtiéndose en excelentes candidatos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer<sup>3-6</sup>. El género *Piper* (Piperaceae) es una fuente valiosa de compuestos fenólicos con diferentes propiedades biológicas<sup>7-11</sup> y constituye una clase importante de plantas medicinales que han sido reportadas para tratar el cáncer en la medicina tradicional de China, India, Oceanía y América Latina<sup>12-15</sup>. Compuestos como la piplartina, hidroxichavicol, 4-nerodilcatecol y los gibbilimboles A-C, son un claro ejemplo de algunos compuestos aislados del género *Piper*, que han mostrado tener propiedades citotóxicas y antitumorales en líneas celulares de cáncer humano, induciendo apoptosis en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*<sup>11,16-19</sup>.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado, esencial para regular la homeóstasis de los tejidos del cuerpo y su evasión ha sido considerada como una de las características más importantes en el desarrollo del cáncer<sup>20</sup>. Algunas alteraciones en proteínas con función antiapoptótica como las proteínas IAP (Proteínas Inhibidoras de

Apoptosis), pueden evitar que la célula entre en apoptosis, promoviendo la proliferación celular descontrolada, que concluye finalmente en la formación y crecimiento de tumores<sup>21</sup>. De estas proteínas, XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) ha sido una de la más estudiadas, esta se compone de tres dominios BIR (BIR1, BIR2 y BIR3) y un dominio RING capaz de unirse a enzimas de ubiquitinación. La función antiapoptótica de XIAP es controlada por Smac/Diablo, una proteína proapoptótica liberada por la mitocondria durante el proceso de apoptosis, que actúa como un antagonista endógeno de XIAP<sup>22</sup>. En los últimos años, el papel de XIAP y su potencial relevancia clínica en el tratamiento del cáncer han sido demostrados en diferentes tipos de tumores, promoviendo el desarrollo de diferentes agentes antitumorales capaces de inhibir la proteína XIAP<sup>23-26</sup>, sin embargo, es necesario buscar nuevas moléculas que permitan establecer enfoques terapéuticos adicionales basados en el antagonismo de la proteína XIAP.

En el presente capítulo, se presentan los resultados de la búsqueda de los mecanismos de muerte celular inducidos por los compuestos eriopodol A, gibbilimbol B y erioquinol, los cuales presentaron el mayor efecto citotóxico en el capítulo anterior. El trabajo presentado en este capítulo fue realizado parcialmente en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias Biomédicas y Clínicas "Hospital Universitario Luigi Sacco" de la Universidad de Milano, Milano, Italia. Los diferentes ensayos realizados sobre las líneas celulares tumorales MCF7 y U373, permitieron establecer que los compuestos gibbilimbol B y eriopodol A inducen apoptosis por medio de permeabilización mitocondrial a partir de la liberación del citocromo c y la posterior activación de caspasas 9 y 7, mientras que el erioquinol induce una muerte celular independiente de caspasas que involucra disfunción mitocondrial y una producción aberrante de especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente, se realizaron estudios *in silico* con el fin de evaluar el potencial efecto antagonista sobre la proteína XIAP a través de la interacción con su dominio BIR3, encontrando que los compuestos eriopodol A, gibbilimbol B y erioquinol, podrían inhibir la acción antiapoptótica de XIAP. Estos resultados, además de confirmar el potencial terapéutico que tienen los compuestos aislados de la especie vegetal *P. eriopodon*, permiten demostrar el papel fundamental que tiene la proteína XIAP en el control de tumores, proporcionando información importante sobre la participación de XIAP en mecanismos de muerte celular tanto dependientes como independientes de caspasas.



## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 General

Los compuestos gibbilibol B, eriopodol A y erioquinol fueron purificados del extracto etanólico de hojas de la especie vegetal *P. eriopodon* por medio de diferentes técnicas cromatográficas utilizando sílica gel y Sephadex LH-20 como fases estacionarias y diferentes sistemas de solventes como fases móviles, como se explica en el capítulo 3. La identificación estructural de los compuestos se realizó por medio de la interpretación de diferentes métodos espectroscópicos, principalmente IR, HRESIMS y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  1D y 2D, tal y como se describe en el capítulo 3.

### 4.2.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma), MCF7 (mama), A549 (pulmón) y PC-3 (próstata) fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco), 2 mM de glutamina y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Lonza) en atmosfera húmeda a 37°C en 5% de  $\text{CO}_2$  (fase de crecimiento logarítmica con pases de rutina cada 3 días). La línea celular epitelial de mama humana MCF10 fue cultivada en una mezcla de medios de cultivo DMEM/F12 Ham's, suplementada con 5% de suero de caballo, factor de crecimiento epitelial 20 ng/mL, insulina 10 ng/mL, hidrocortisona 0.5 mg/mL, toxina de cólera 100 ng/mL y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Lonza). Las células HUVEC (células endoteliales de vena de cordón umbilical humano) fueron cultivadas en medio especial de crecimiento de células endoteliales EGM-2 Bullekit (Lonza) de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante. El suero fetal bovino, suero de caballo, glutamina y el antibiótico penicilina/streptomicina se obtuvieron de EuroClone (Milano, Italia). El TMRM (éster metílico de tetrametilrodamina) fue comprado a ThermoFisher Scientific, la necrostatina-1 y ferrostatina-1 fueron obtenidas de Santa Cruz Biotechnology. Los demás reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

### 4.2.3 Ensayo de Citotoxicidad

La viabilidad sobre las líneas celulares U373, MCF7, A549, PC-3, HUVEC y MCF10 fue determinada por el ensayo de reducción del MMT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)<sup>27</sup>. Las células fueron sembradas en platos de 96 pozos ( $10^4$  células/pozo) en

100  $\mu$ L de medio suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina y se dejó en reposo durante 24 h en atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el medio fue removido y se aplicaron 100  $\mu$ L de medio fresco, en concentraciones seriadas de (100, 30, 10, 1.0 y 0.1  $\mu$ g/mL) de los extractos etanólicos disueltos en DMSO (0.2%). Después de 24 h, se retiró el medio, se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de MTT (0.5 mg/mL) en PBS y los platos se incubaron por un periodo de 4 h a 37°C en atmosfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se removió el sobrenadante, se agregaron 100  $\mu$ L de buffer de lisis y se midió la absorbancia en un lector de placas Glomax Multi Detection System (Promega, Milano, Italia). Las células no tratadas se usaron como control positivo y la supervivencia celular se calculó como: % supervivencia = 100 (X/control), donde X es el promedio de la lectura del metabolismo de MTT en un grupo de tratamiento (n=4). Los valores de Concentración Inhibitoria 50 - IC<sub>50</sub> - (concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular) para los extractos etanólicos se calcularon usando el software GraphPad Prism. Los datos son reportados como el promedio  $\pm$  el error estándar.

#### **4.2.4 Ensayo TUNEL**

Las células MCF7 y U373 fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 120 mm recubiertos con poli-L-lisina y fijadas en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.4 por 10 minutos<sup>28,29</sup>. Para determinar apoptosis por la técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), se utilizó el kit de detección de apoptosis (Promega DeadEnd fluorometric TUNEL system) siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de los núcleos se realizó por medio de tinción con DAPI.

#### **4.2.5 Inmunofluorescencia**

Las células MCF7 y U373 fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 120 mm recubiertos con poli-L-lisina y fijadas en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.4 por 10 minutos<sup>28,29</sup>. Posteriormente, las células fueron preincubadas por una hora con solución al 5% de suero de cabra (Life Technologies) en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.4) que contenía 0.1% de Triton X-100 y se dejaron incubando toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal anti-caspasa 7 clivada (1:1600, Cell Signaling Technology, Ref: 8438) obtenido de conejo. En los experimentos de Inmunofluorescencia de doble marcaje, se utilizó el anticuerpo primario monoclonal anti-citocromo C (1:1300, Cell Signaling Technology, Ref: 12963) obtenido de

ratón, junto con un anticuerpo primario monoclonal dirigido a COX IV (1:250, Cell Signaling Technology, Ref: 4850) obtenido de conejo. El núcleo y/o el citoesqueleto fueron teñidos con DAPI y faloidina fluorescente (ThermoFisher Scientific). Para la detección de fluorescencia, los cubreobjetos se tiñeron con los anticuerpos secundarios fluorescentes apropiados Alexa Fluor (Life Technologies) y se montaron en láminas de vidrio utilizando medio de montaje ProLong® Gold Antifade Mountant (Life Technologies). Finalmente, las células fueron analizadas con un microscopio invertido automático Leica DMI4000 B equipado con una cámara digital DCF310 (Leica Microsystems). Se realizaron capturas por microscopía confocal en un sistema TCS SP8 (Leica Microsystems). La adquisición de las imágenes fue controlada con el software Leica Application Suite X.

#### **4.2.6 Citometría de flujo**

Las células MCF7 fueron incubadas con 5 µg/mL de Annexina V-FITC para determinar la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática, junto con 5 µg/mL de yoduro de propidio (PI) para excluir las células necróticas, en buffer de unión (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)<sup>30</sup>. La tinción celular se analizó por medio de citometría de flujo en un citómetro Gallios (Beckman-Coulter) utilizando el software FCS Express 4 (De Novo System).

#### **4.2.7 Western Blot**

Las células MCF7 y MCF10 se lisaron en frío utilizando buffer RIPA suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (cOmplete; Roche)<sup>29</sup>. Posterior a la cuantificación, se separaron iguales cantidades de proteína en un gel de electroforesis SDS-poliacrilamida 4-20% (Criterion TGX Stain-free precast gels and Criterion Cell system; Bio-Rad) y posteriormente fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema Bio-Rad Trans-Blot Turbo. Las membranas fueron bloqueadas y posteriormente incubadas toda la noche con los respectivos anticuerpos primarios; anti-XIAP (1:1000, Cell Signaling Technology, Ref: 14334) y anti-caspasas 9 y 7 clivadas (1:1000, Cell Signaling Technology, Ref: 20750 y 8438) obtenidos de conejo. Después de la incubación con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa (1:1000, Cell Signaling Technology, Ref: 7074 y 7076; Santa Cruz Biotechnology, Ref: sc2020), se visualizaron las bandas usando el revelador Clarity Western ECL con el sistema ChemiDoc MP Imagin (Bio-Rad). Como control se utilizaron los anticuerpos primarios anti-lactato deshidrogenasa (LDH)-A obtenido de cabra (1:1000, Santa Cruz Biotechnology,

Ref: sc27230) y anti-vinculina obtenido de ratón (1:1000, Sigma-Aldrich, Ref: SAB4200080). Las bandas fueron cuantificadas por densitometría usando el software Bio-Rad Image Lab software.

#### **4.2.8 Potencial de Membrana Mitocondrial**

El potencial de membrana mitocondrial de las células MCF7 y U373 se midió mediante tinción mitocondrial con TMRM (éster metílico de tetrametil rodamina), un colorante catiónico lipofílico sensible al voltaje de las membranas de las mitocondrias<sup>31</sup>. Después de los tratamientos, las células fueron tripsinizadas, contadas e incubadas con una concentración 100 nM de TMRM por 30 minutos a 37 °C. La fluorescencia se midió usando un lector de microplacas Glomax Multi Detection System (Promega) a una longitud de onda de excitación de 525 nm y un rango de emisión de 580-640 nm. Después de substrair el background, los datos fueron normalizados de acuerdo al número de células.

#### **4.2.9 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)**

Las células MCF7 y U373 fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 120 mm recubiertos con poli-L-lisina y expuestas a una concentración 30  $\mu$ M de DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4; y fijadas en paraformaldehído al 4% por 20 minutos. Para la detección de fluorescencia, los cubreobjetos fueron montados en láminas de vidrio y observados con un microscopio confocal Leica Microsystems TCS SP8 y la adquisición de las imágenes fue controlada con el software Leica Application Suite X. El núcleo y/o el citoesqueleto fueron teñidos con DAPI y faloidina fluorescente.

#### **4.2.10 Modelado molecular**

El procedimiento de acoplamiento molecular se llevó a cabo con el programa AutoDock 4.2. Para realizar los cálculos se utilizó la estructura cristalográfica PDB 5C83 reportada en el Protein Data Bank<sup>32</sup>. La macromolécula fue preparada la herramienta *Protein Preparation Wizard* del programa Free Maestro (Schrödinger Release 2019-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.) y visualizada con el programa PyMOL (version 2.0, PyMol Molecular Graphics, Schrodinger, New York, NY, USA); el dominio BIR3 de XIAP fue seleccionado como receptor<sup>33</sup>. Una vez lista la macromolécula se trazaron mapas de energía para todos los tipos de átomos del ligando con el programa AutoGrid4 y para realizar los cálculos se utilizó una

rejilla (grid) de 50x50x50 puntos y 25 millones de evaluaciones de energía. Los resultados del acoplamiento molecular fueron visualizados con el programa computacional Maestro 11.6. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el paquete de simulación Desmond de Maestro (Desmond Molecular Dynamics System; D. E. Shaw Research, New York, NY, USA, 2016), usando los parámetros del campo de fuerza OPLS 2005. Se utilizó un sistema de solvatación TIP3P y el modelo predefinido para un sistema eléctricamente neutro (concentraciones fisiológicas de iones monovalentes, NaCl 0.15 M) en una caja ortorrómbica a temperatura constante (300 K) en todas las simulaciones. Los resultados de la dinámica molecular fueron analizados mediante la aplicación Simulation Interaction Diagram del paquete Desmond, revisando el comportamiento y estabilidad de las simulaciones por medio de variaciones en el RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de las posiciones de los átomos del ligando y la proteína en función del tiempo.

#### **4.2.11 ARN de interferencia**

El silenciamiento génico de XIAP se realizó mediante kit iBONI siRNA Pool (Riboxx, Radebeul, Alemania) dirigido a XIAP humano, de acuerdo a protocolos previamente estandarizados<sup>29</sup> y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el kit de silenciamiento dirigido a XIAP humano fue mezclado con el reactivo de transfección Lipofectamina RNAiMax (Life Technologies) y aplicado en células MCF7 a una concentración de 50 nM por 24 h. También se utilizó el control negativo iBONI siRNA Pool (Riboxx).

#### **4.2.12 PCR en Tiempo Real**

La extracción del RNA de las células MCF7 se realizó con el Kit de aislamiento de ARN High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de primera cadena de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA usando el Kit iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad)<sup>29</sup>. La secuencia de primers específicos diseñados para XIAP (Eurofins Genomics, Milano, Italia) fue la siguiente (NM\_001167; Directo ACCGTGCGGTGCTTTAGTT, Inverso TGCGTGGCACTATTTTCAAGATA) y para β-actina (NM\_001101; Directo ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC, Inverso CACCTTCTACAAT GAGCTGCGTGTG). La PCR se realizó utilizando el Kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix en el equipo de detección de PCR CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El número de veces de cambio en la expresión fue determinado como

relativo a la muestra control seleccionada, después de normalizar con  $\beta$ -actina (estándar interno) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### **4.2.13 Análisis Estadístico**

Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El análisis estadístico de los datos entre grupos en cada experimento fue evaluado por medio de una prueba t de Student para muestras independientes o un análisis de varianza de una vía (ANAVA), seguida de una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. La concentración  $IC_{50}$  fue determinada por medio de un análisis de la curva de regresión no lineal de respuesta al efecto de la concentración. Para todos los análisis estadísticos y las gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism.

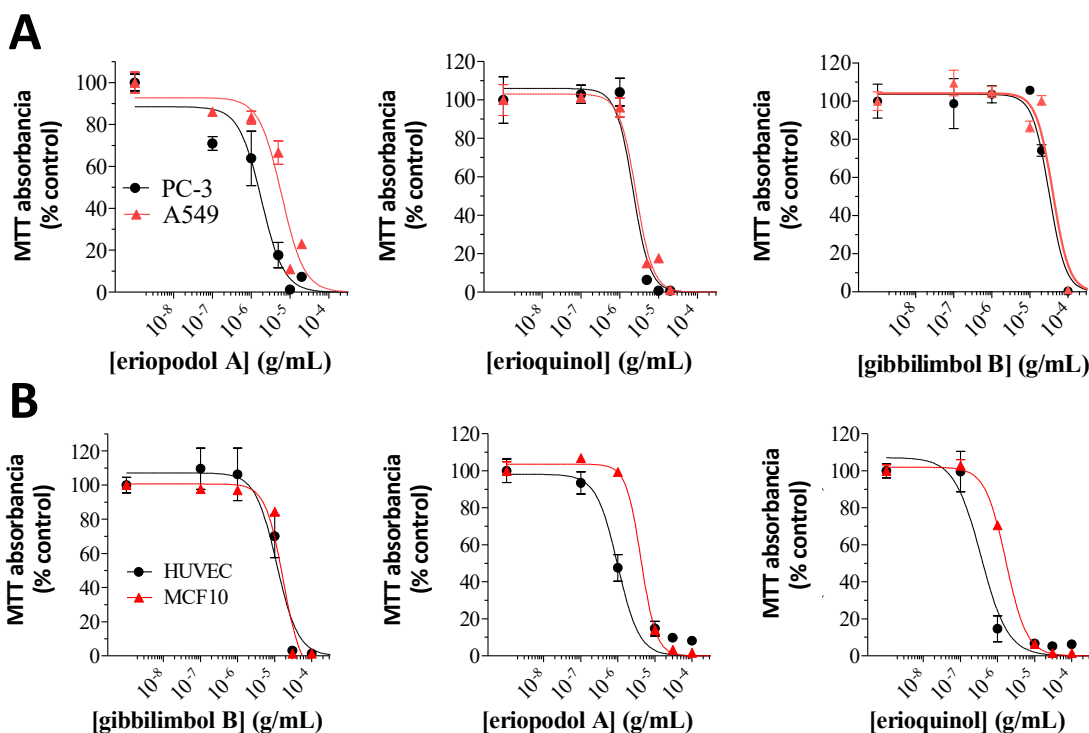
### **4.3 Resultados y Discusión**

#### **4.3.1 Efectos citotóxicos de los compuestos aislados de *P. eriopodon***

Los compuestos eriopodol A, gibbilimbol B y erioquinol aislados de *P. eriopodon*, mostraron tener el mayor efecto citotóxico por MTT en células de glioblastoma U373 y células de cáncer de mama MCF7 (sección 3.3.2), por lo cual fueron seleccionados para realizar ensayos adicionales de MTT en las líneas celulares PC-3 (cáncer de próstata) y A549 (cáncer de pulmón), usando el gibbilimbol B como compuesto de referencia<sup>19,34</sup>. La actividad citotóxica de estos tres compuestos también fue evaluada en células HUVEC (células endoteliales de vena de cordón umbilical humano) y en la línea celular no tumoral de mama humana MCF10 a tiempos de 24 horas (Figura 4-1).

Los resultados del ensayo del MTT confirman el potencial citotóxico de los compuestos eriopodol A y erioquinol, con valores de  $IC_{50}$  de 6.12 y 2.65  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente en la línea celular A549; y de 1.84 y 2.21  $\mu\text{g/mL}$  en la línea celular PC-3 (Figura 4-1A). Estos valores de  $IC_{50}$  para el eriopodol A y erioquinol, demuestran que estos compuestos tienen un efecto citotóxico más potente que el gibbilimbol B, que tuvo un  $IC_{50}$  de 39.7  $\mu\text{g/mL}$  en la línea celular A549 y de 32.2  $\mu\text{g/mL}$  en la línea celular PC-3. Respecto a los resultados de  $IC_{50}$  obtenidos en las células HUVEC, los valores para el gibbilimbol B, eriopodol A y erioquinol fueron de 11.49, 0.99 y 0.36  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y en la línea celular MCF10 fueron de 17.11, 4.27 y 1.70  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4-1B). Las diferencias encontradas en los valores de  $IC_{50}$  en estas líneas

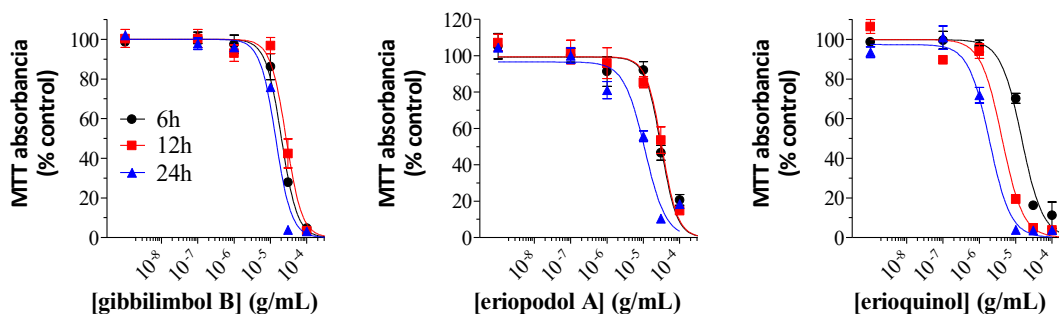
celulares no transformadas y altamente proliferantes, sugiere que su modo de acción no es específico para células cancerígenas. Sin embargo, es conocido que muchos compuestos citotóxicos utilizados en quimioterapia afectan principalmente las células que proliferan rápidamente, lo cual llega a impactar a las poblaciones celulares normales altamente proliferativas, tales como las células de la médula ósea, entre otras<sup>35,36</sup>.



**Figura 4-1:** Efecto citotóxico de los compuestos gibbibilbol B, eriopodol A y erioquinol en líneas celulares humanas de cáncer y en células no transformadas. **(A)** Células PC-3 y A549 y **(B)** células HUVEC y MCF10 tratadas con concentraciones crecientes de gibbibilbol B, eriopodol A y erioquinol por 24 h, antes de realizar el ensayo del MTT.

Como una medida de la potencia de los compuestos aislados sobre la línea celular MCF7, se realizaron diferentes experimentos de inhibición de la viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición de los compuestos (Figura 4-2). Las curvas de viabilidad celular indican que la potencia del gibbibilbol B no cambia considerablemente en ninguno de los tiempos evaluados ( $IC_{50-6h}$ : 20.31  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50-12h}$ : 27.36  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50-24h}$ : 16.44  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que para el eriopodol A, se ve un incremento significativo a las 24 h ( $IC_{50-6h}$ : 31.19  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50-12h}$ : 32.75  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50-24h}$ : 10.12  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 4-2). Respecto a la potencia del erioquinol, ésta fue mucho mayor que la observada para los otros dos compuestos en cada uno de los tiempos

evaluados, observando un aumento en función del tiempo de exposición ( $IC_{50-6h}$ : 14.72  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50-12h}$ : 4.25  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50-24h}$ : 1.93  $\mu\text{g/mL}$ ). Estos resultados comparativos obtenidos en la línea celular MCF7, indican que el erioquinol es el compuesto más potente, que actúa con una cinética más rápida en comparación con los otros dos compuestos.



**Figura 4-2:** Viabilidad celular a diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) de exposición de los compuestos gibbilimbol B, eriopodol A y erioquinol a diferentes concentraciones (100, 30, 10, 1.0 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre la línea celular MCF7, antes de realizar el ensayo del MTT.

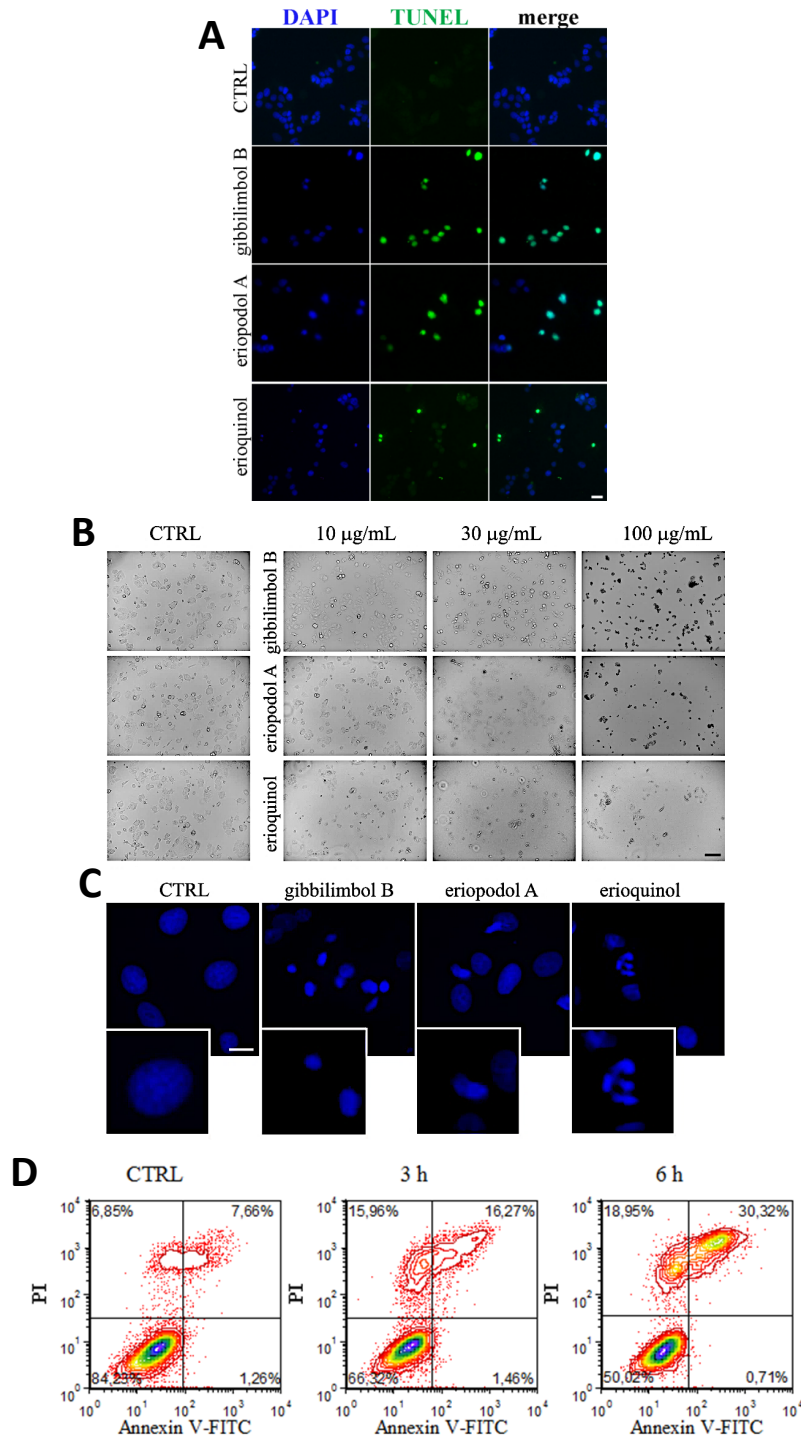
### 4.3.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular

Con el fin de tener una aproximación al mecanismo de muerte celular inducido por los tres compuestos en células tumorales, se realizaron diferentes experimentos para establecer si los compuestos eran inductores de apoptosis. Las concentraciones de los compuestos utilizadas en los ensayos corresponden con la concentración mínima que produce el máximo efecto en los ensayos de MTT: 30  $\mu\text{g/mL}$  para el gibbilimbol B y eriopodol A; y 10  $\mu\text{g/mL}$  para el erioquinol.

Inicialmente, se realizó el ensayo TUNEL para determinar el daño en el ADN en las células tratadas con los compuestos por 12 h, en el cual se observó un incremento en núcleos fluorescentes en células tratadas con gibbilimbol B y eriopodol A (Figura 4-3A), demostrando que hay degradación del ADN, típica de un estado de apoptosis tardía. Por otra parte, se observaron pocas células con marcación positiva a la degradación del ADN cuando fueron tratadas con erioquinol (Figura 4-3A). Adicionalmente, cuando las células MCF7 se trataron por un periodo de 6 h con concentraciones crecientes de los compuestos, las células que fueron sometidas a tratamientos con eriopodol A y gibbilimbol B, mostraron características morfológicas típicas de apoptosis, tales como contracción citoplasmática, redondez progresiva



y condensación nuclear, mientras que las células tratadas con erioquinol mostraron un citoplasma translúcido y carencia de condensación nuclear (Figura 4-3B).



**Figura 4-3:** Muerte celular inducida por los compuestos aislados de *P. eriopodon* en células MCF7. **(A)** Ensayo TUNEL sobre células MCF7 tratadas por 12 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilimbol B/eriopodol A (30 µg/mL) y erioquinol (10 µg/mL). La tinción de los núcleos se realizó con DAPI y la

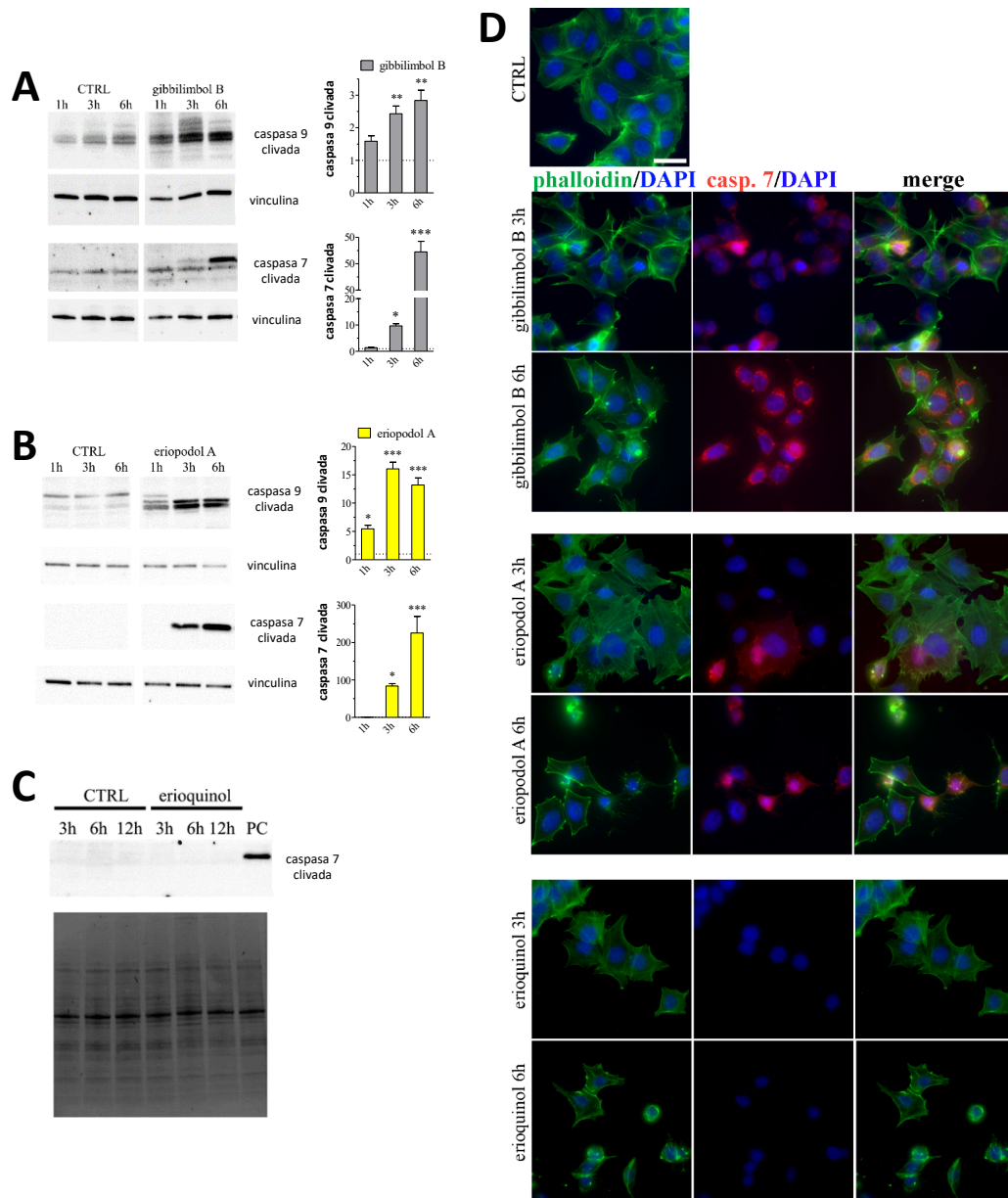
barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Células MCF7 vistas al microscopio de campo claro, tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B, eriopodol A o erioquinol en concentraciones crecientes. La barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **(C)** Tinción con DAPI de células MCF7 tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . **(D)** Citometría de flujo de células MCF7 en ausencia (CTRL) o en presencia de erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 3 y 6 h y sometidas a tinción con Anexina V/PI. Los eventos indicados en el cuadrante inferior izquierdo corresponden a las células sin marcar y en cada uno de los cuadrantes se indica la proporción relativa de células marcadas. Las imágenes y los datos presentados son representativos de cuatro experimentos independientes.

De forma similar, cuando las células MCF7 se trataron por 6 h con 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gibbilibol B o eriopodol A y se sometieron a tinción con DAPI (4',6-diamidino2-fenilindol) para determinar la condensación nuclear, se observaron núcleos condensados de menor tamaño, característicos de células en proceso de apoptosis, mientras que los cambios observados en el tratamiento con erioquinol fueron asociados a núcleos fragmentados (Figura 4-3C).

Respecto al análisis por citometría de flujo utilizando tinción con Anexina V y PI en células MCF7 tratadas con erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se observó una degradación rápida y progresiva de la membrana celular, resultado que es característico de procesos de apoptosis tardíos por la tinción positiva tanto de Anexina V como de PI, mientras que el patrón de apoptosis temprana característico de tinciones con respuesta Anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> no se detectó durante el experimento (Figura 4-3D).

El análisis de proteínas realizado por western blot en células MCF7 tratadas con 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gibbilibol B o eriopodol A y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de erioquinol en tiempos de 1, 3 y 6 h de tratamiento, mostró activación de caspasa 9 y posterior activación de caspasa 7, únicamente en las células tratadas con gibbilibol B y eriopodol A (Figura 4-4A,B), mientras que las células tratadas con erioquinol no mostraron activación de caspasa 9, ni de caspasa 7 (Figura 4-4C).

Estos resultados fueron confirmados por medio de experimentos de inmunofluorescencia, en los cuales se aprecia una tinción intensa y progresiva de caspasa 7 clivada, que con el paso del tiempo se hace más evidente en el citoplasma de las células MCF7 tratadas con gibbilibol B y eriopodol A, mientras que en las células tratadas con erioquinol no se observó ninguna señal de activación de caspasa 7, incluso las células tratadas con erioquinol durante tiempos de 12 h tampoco mostraron ninguna actividad de caspasas (Figura 4-4D).



**Figura 4-4:** Activación de caspasas 9 y 7 por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. Análisis por western blot de caspasas 9 y 7 clivadas, en células MCF7 tratadas a diferentes tiempos en ausencia (CTRL) y presencia de **(A)** gibbilimbol B o **(B)** eriopodol A (30 µg/mL) utilizando vinculina como control. Las densitometrias fueron realizadas sobre el control vinculina. Las imágenes son representativas de tres a cinco experimentos independientes. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  y \*\*\* $p < 0.0001$  relativo al control. **(C)** Análisis por western blot de caspasas 9 y 7 clivadas, en células MCF7 tratadas a diferentes tiempos en ausencia (CTRL) o presencia de erioquinol (10 µg/mL). El gel de corrida se utilizó como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. PC: control positivo. **(D)** Inmunofluorescencias de caspasa 7 clivada (rojo) en células MCF7 tratadas en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilimbol B/eriopodol A (30 µg/mL) y erioquinol (10 µg/mL). Los núcleos (azul) fueron

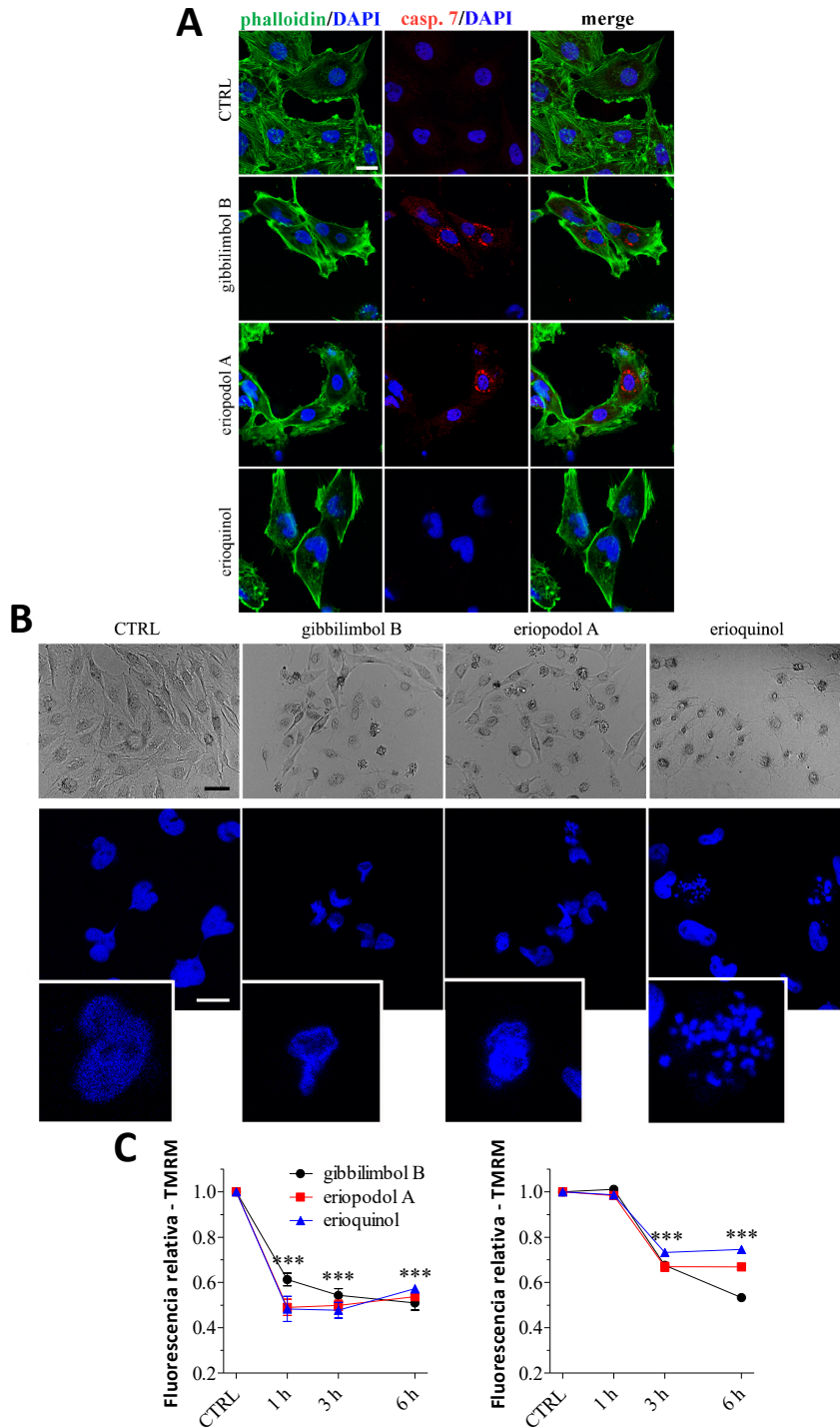
teñidos con DAPI y el citoesqueleto (verde) con faloidina. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 25  $\mu\text{m}$ .

Resultados similares fueron obtenidos para tratamientos realizados por un tiempo de 6 h con los compuestos eriopodol A y gibbilimbol B a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la línea celular U373, en los cuales también fue evidente la actividad de caspasa 7 clivada en el citoplasma celular, así como la inducción de cambios morfológicos similares a los observados en las células MCF7 (Figura 4-5A,B). Por otro lado, las células U373 que fueron tratadas con erioquinol a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 6 h, también presentaron un patrón de respuesta muy similar al que mostraron las células MCF7, como la presencia de citoplasma translúcido y núcleos fragmentados (Figura 4-5B).

Se observó que las células U373 y las células MCF7 respondieron de forma similar a los tratamientos con los tres compuestos, tanto el gibbilimbol B como el eriopodol A indujeron efectos apoptóticos, mientras que el erioquinol mostró tener efectos no apoptóticos, permitiendo suponer que los mecanismos de muerte celular inducidos por los compuestos son comparables en las dos líneas tumorales. Así mismo, en la línea celular MCF10 también fue evidente la activación de caspasa 7 cuando se trataron las células con los compuestos gibbilimbol B y eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a diferencia del tratamiento con erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Anexo A-Figura 5-44A).

Posteriormente, se evaluó la funcionalidad mitocondrial en las células tratadas con los compuestos por medio de un ensayo de fluorescencia a partir de tinción de la mitocondria con TMRM (Figura 4-5C), el cual es capturado únicamente por las mitocondrias funcionales.

Las lecturas de fluorescencia se realizaron con tiempos de tratamiento de 1, 3 y 6 h utilizando concentraciones de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para gibbilimbol B o eriopodol A y de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el erioquinol. Los resultados mostraron que tanto las células MCF7 como U373 tratadas con los tres compuestos, presentaron una disminución similar en la fluorescencia del TMRM (Figura 4-5C), lo cual indica que hay reducción del potencial de membrana mitocondrial, incluso la funcionalidad mitocondrial de las células MCF7 disminuyó considerablemente a tiempos de tratamiento de 1 h, sugiriendo estos resultados que los tratamientos con los tres compuestos reducen la funcionalidad mitocondrial.



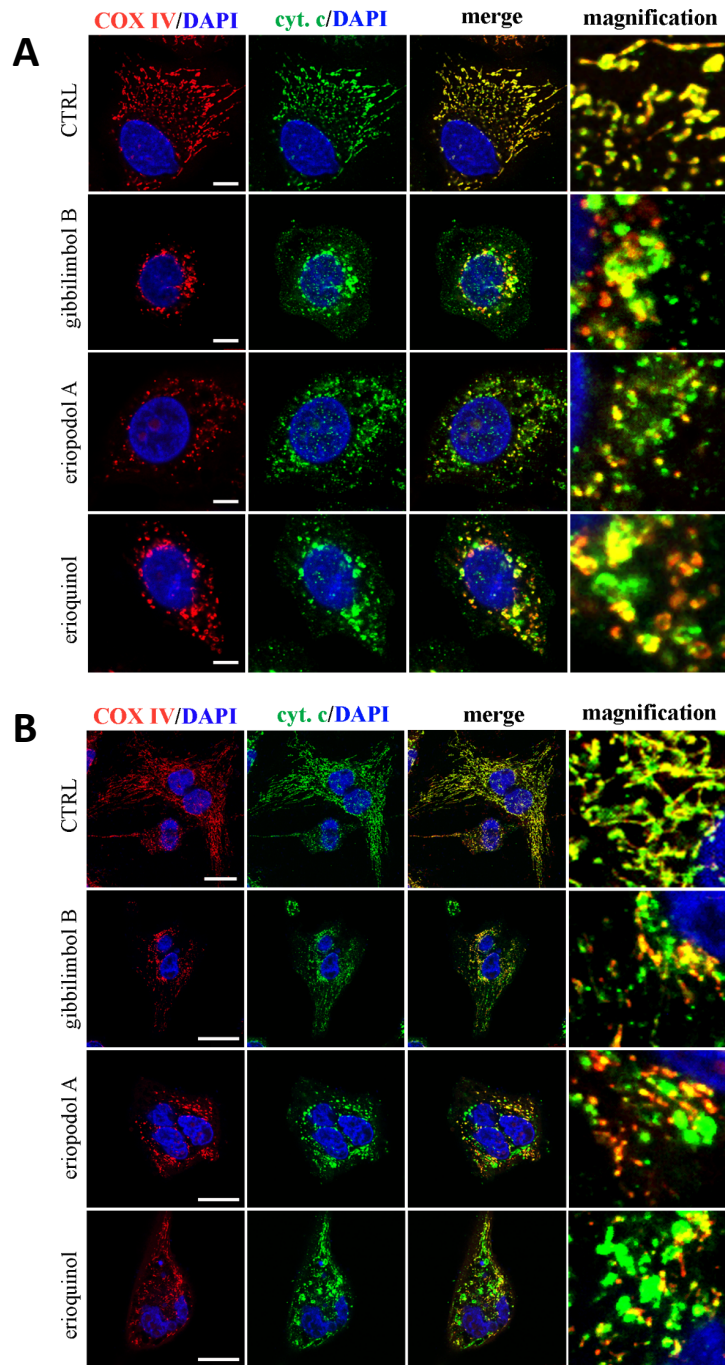
**Figura 4-5:** Muerte celular y disfunción mitocondrial inducida en células U373 por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Imágenes de inmunofluorescencia confocal de caspasa 7 clivada (rojo) en células U373 tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de gibbilimbol B/eriopodol A (30 µg/mL) y erioquinol (10 µg/mL). Los núcleos (azul) fueron teñidos con DAPI y el citoesqueleto (verde) con faloidina. La barra de escala corresponde a 25 µm. **(B)** Células U373 vistas al microscopio de campo claro (panel superior) y sometidas a tinción con DAPI (panel inferior), tratadas por 6 h en ausencia

(CTRL) o en presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30 µg/mL) y erioquinol (10 µg/mL). La barra de escala corresponde a 50 µm (panel superior) y 10 µm (panel inferior). **(C)** Análisis cuantitativo de la fluorescencia del ester metílico de tetrametilrodamina (TMRM) en función del tiempo, en células MCF7 (izquierda) y U373 (derecha) en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30 µg/mL) y erioquinol (10 µg/mL). Los resultados son expresados ajustando la fluorescencia del TMRM con las respectivas muestras control (tratadas con el vehículo), establecidas como 1 en ausencia de compuestos. \*\*\* $p < 0.0001$  relativo al control. Las imágenes y los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

Durante los procesos apoptosis, la disminución en el potencial de membrana mitocondrial es uno de los factores característicos asociados a la liberación de citocromo c al citoplasma, desencadenando así la cascada apoptótica. Con el fin de evaluar la liberación de citocromo c, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en las líneas celulares U373 y MCF7 bajo tratamientos con 30 µg/mL de gibbilibol B o eriopodol A y 10 µg/mL de erioquinol, expuestas por periodos de 3 h.

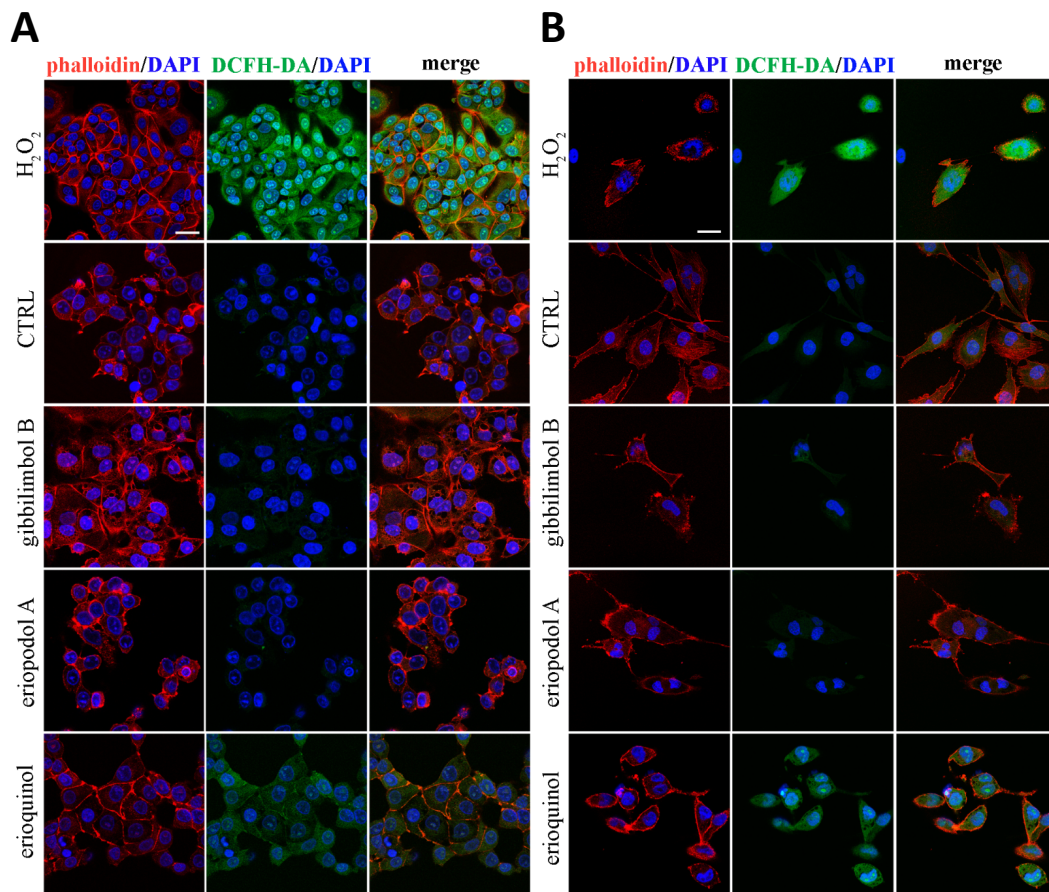
La Figura 4-6 muestra los resultados de la inmunofluorescencia para las células MCF7 y U373, en las que se puede apreciar el citocromo C (verde), las mitocondrias (marcadas en rojo con COX IV) y los núcleos celulares (Azul). En el grupo control se observó una colocalización de la marcación roja específica para la mitocondria con el citocromo C con una coloración amarilla. Por otra parte, la administración de gibbilibol B, eriopodol A y erioquinol, muestra patrones de coloración diferentes al control, evidenciándose coloración verde, roja y amarilla con un patrón punteado; y para el caso de la marcación verde se encuentran patrones compactos y difusos, de tamaños superiores a los mitocondriales en el control (Figura 4-6A y B), demostrando estos resultados que el citocromo c (verde) no se encuentra colocalizado con las mitocondrias y que por lo tanto hay una liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma celular.

La disfunción mitocondrial ha sido asociada al estrés celular y es considerada como una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular. También se ha demostrado que muchas células tumorales sobreviven bajo condiciones elevadas de estrés oxidativo endógeno, por lo que alterar los niveles de ROS podría determinar un papel fundamental en el destino de las células tumorales<sup>37</sup>. Con el propósito de evaluar los niveles de ROS, las células MCF7 y U373 se sometieron a tinción con DCFH-DA, un colorante fluorogénico permeable a la célula que mide la actividad de diferentes ROS como radicales hidroxilo y peróxido.



**Figura 4-6:** Microscopía confocal para determinar la colocalización de citocromo c con las mitocondrias. Las células **(A)** MCF7 y **(B)** U373 fueron tratadas por 3 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células fueron marcadas para citocromo c (verde), mitocondrias (rojo, COX IV) y los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$  (MCF7) y 25  $\mu\text{m}$  (U373).

La Figura 4-7 muestra el resultado de la acumulación de ROS a nivel celular durante los tratamientos con los compuestos, la coloración roja corresponde a la faloidina y la coloración verde corresponde al DCFH-DA producto de la acumulación de ROS. Entre las células control (CTRL) y las células tratadas con  $H_2O_2$  se observa un incremento masivo de la marcación verde, el cual es el indicativo de una gran acumulación de ROS en el citoplasma, tanto para las células MCF7 como para las células U373.



**Figura 4-7:** Microscopía confocal para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células **(A)** MCF7 y **(B)** U373 fueron tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente se realizó el marcaje de ROS con DCFH-DA (verde), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y el citoesqueleto con faloidina (rojo). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 25  $\mu\text{m}$ .

Estos radicales no se observaron durante los tratamientos con eriopodol A o gibbilibol B a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 6 h, mientras que en el tratamiento con erioquinol a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 6 h, se observó un marcaje citoplasmático (verde) característico de una fuerte acumulación de ROS tanto en la línea celular MCF7 como en la U373 (Figura 4-7). Estos resultados encontrados

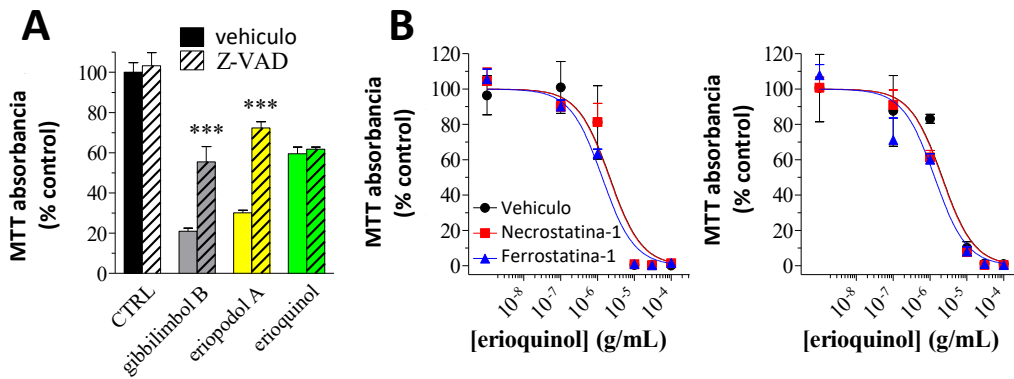


después del tratamiento con erioquinol, en los que se observa un incremento de ROS, junto con la no activación de caspasas, diferencian los mecanismos de muerte celular respecto a los mecanismos inducidos por los compuestos gibbilimbol B y eriopodol A. En efecto, el tratamiento con erioquinol no produce activación de caspasas, pero es probable que induzca un fuerte estrés mitocondrial que se ve reflejado en la producción y liberación de ROS al citoplasma celular.

Finalmente, se confirmó el efecto apoptótico de los compuestos gibbilimbol B y eriopodol A por medio de la inhibición de las caspasas durante su actividad citotóxica, utilizando el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-(OMe)-FMK. La figura 4-8A muestra los resultados de MTT de la actividad citotóxica ejercida por los tratamientos con eriopodol A y gibbilimbol B a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en células MCF7, en la cual se observó una inhibición significativa de la citotoxicidad en presencia del inhibidor Z-VAD-(OMe)-FMK a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , evidenciando la dependencia de caspasas en el mecanismo de acción de los dos compuestos. Por otro lado, la adición simultánea del inhibidor Z-VAD-(OMe)-FMK junto con el tratamiento de erioquinol a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no redujo la actividad citotóxica del compuesto, confirmando así que su efecto no depende de la activación de caspasas.

El conjunto de resultados obtenidos para los compuestos gibbilimbol B y eriopodol A permiten demostrar que estos dos compuestos inducen apoptosis por medio de la vía intrínseca, desencadenada inicialmente por permeabilización de membrana mitocondrial, seguida de la liberación de citocromo c, una activación temprana de caspasa 9 y consecutivamente de caspasa 7. Respecto al erioquinol, se evidenció un mecanismo de muerte celular diferente, aunque reduce el potencial de membrana mitocondrial y produce liberación de citocromo c, este compuesto produce incrementos anormales de ROS, con características de mecanismos de muerte no apoptóticos independientes de caspasas.

La muerte celular independiente de caspasas fue descrita inicialmente como un proceso que afectaba el potencial de la mitocondria y causaba permeabilización de la membrana mitocondrial, pero sin activación de la vía de las caspasas<sup>38</sup>, características que son similares a los resultados obtenidos en este trabajo con el erioquinol y que han sido reportadas para algunos compuestos naturales que inducen muerte celular programada no apoptótica<sup>39</sup>.



**Figura 4-8:** Muerte celular dependiente e independiente de caspasas, inducida por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Las células MCF7 fueron tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g/mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g/mL}$ ), junto con el inhibidor de pancaspasas Z-VAD-(OMe)-FMK (50  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo, antes de realizar el ensayo del MTT. Los resultados son expresados ajustando la absorbancia del MTT con las respectivas muestras control, establecidas como el 100 %. Los datos son representativos de cuatro a doce experimentos independientes.  $***p < 0.0001$  relativa al tratamiento del respectivo compuesto con el vehículo. **(B)** Las células MCF7 (izquierda) y U373 (derecha) fueron tratadas con concentraciones crecientes (0, 0.1, 1.0, 10, 30, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de erioquinol por 24 h antes del ensayo del MTT. Los tratamientos fueron realizados en ausencia (vehículo) o en presencia de los inhibidores de necroptosis (necrostatina-1 a 50  $\mu\text{M}$ ) y ferroptosis (ferrostatina-1 a 10  $\mu\text{M}$ ) con 2 h de pretratamiento. Los resultados son expresados ajustando la absorbancia del MTT con las respectivas muestras control, establecidas como el 100 %. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

Se han reportado varios mecanismos de muerte celular diferentes de la apoptosis<sup>40-42</sup>. Por ejemplo, la necroptosis y ferroptosis son dos formas de muerte celular programada no apoptótica, que no involucran la participación de caspasas en sus mecanismos de muerte y que pueden ser inhibidas respectivamente por acción de las proteínas necrostatina-1 y ferrostatina-1<sup>42</sup>. En este sentido y con el fin de determinar si el efecto producido por el erioquinol podría estar relacionado con procesos de necroptosis o ferroptosis, se trataron células MCF7 y U373 con concentraciones crecientes de erioquinol por 24 h en presencia o ausencia de necrostatina-1 a 50  $\mu\text{M}$  y ferrostatina-1 a 10  $\mu\text{M}$  por 2 h de pretratamiento. Como se puede ver en la figura 4-8B el efecto del erioquinol en la inhibición del crecimiento celular se mantiene dependiente de la concentración y sin producir cambios en la absorbancia del MTT, aún cuando está en presencia de los dos inhibidores.

Estos resultados sugieren que la muerte celular inducida por el erioquinol es independiente tanto de necroptosis como de ferroptosis. Recientemente, el incremento de ROS ha sido asociado a una nueva forma de muerte celular independiente de caspasas denominada oxeiptosis, la cual tampoco puede ser inhibida por necrostatina-1 ni ferrostatina-1 y que por

lo tanto, al igual que la muerte inducida por el erioquinol, involucra mecanismos de muerte diferentes a necroptosis y ferroptosis<sup>43</sup>. Dadas las características de esta forma de muerte celular, se puede suponer que el tratamiento con erioquinol podría desencadenar una cascada similar de eventos a los producidos en la oxoiptosis, sin embargo, se requiere de trabajo adicional para caracterizar totalmente el papel de la producción de ROS en el proceso de muerte celular inducido por este compuesto.

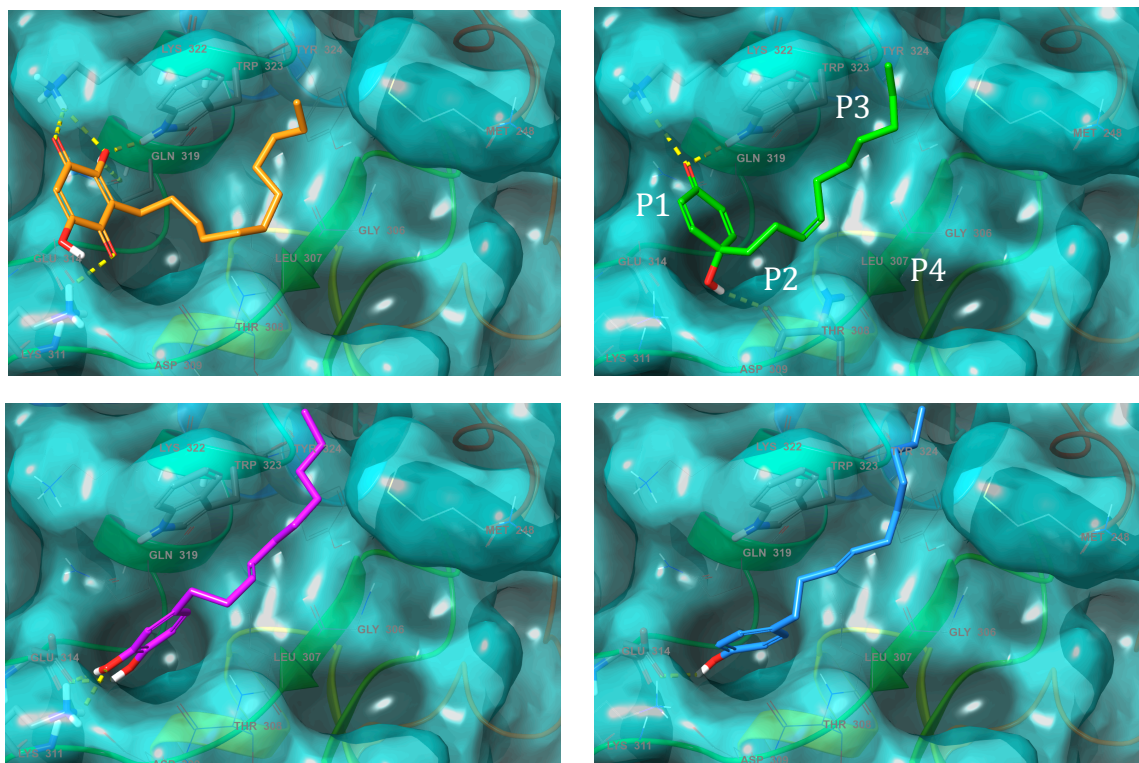
### **4.3.3 Proteína XIAP como blanco molecular de los compuestos aislados de *P. eriopodon***

La proteína XIAP es considerada como uno de los inhibidores más potentes de la apoptosis, debido a que inhibe la acción enzimática de las caspasas 3/7 y 9 por medio de la unión a sus dominios BIR2 y BIR3 respectivamente<sup>44-46</sup>. Por otro lado, también se ha reportado que la proteína XIAP no solo inhibe los procesos de apoptosis, sino que también puede regular otras vías funcionales que son independientes de caspasas, lo que le da la posibilidad de controlar diferentes procesos de muerte o supervivencia celular a través de múltiples mecanismos<sup>22,24,47-49</sup>.

La importancia de XIAP y su potencial relevancia clínica en el tratamiento del cáncer, han sido demostrados en los últimos años en diferentes tipos de tumores, promoviendo así el desarrollo de diferentes agentes antitumorales capaces de inhibir la función antiapoptótica de la proteína XIAP<sup>23-26</sup>. Uno de los compuestos caracterizados como inhibidores de XIAP es la embelina, una alquilbenzoquinona natural con gran potencial terapéutico frente a distintos tipos de cáncer, fue aislada de la especie vegetal *Embelia ribes* y su gran capacidad como agente inhibidor de la proteína XIAP fue descubierto por medio de acoplamiento molecular, a través del análisis de la interacción de más de 8200 moléculas con el dominio BIR3 de XIAP<sup>50</sup>.

Teniendo en cuenta que el erioquinol y la embelina comparten ciertas características químicas estructurales, se decidió evaluar por medio de acoplamiento molecular si los compuestos erioquinol, eriopodol A y gibbbilimbol B podrían unirse al dominio BIR3 de la proteína XIAP en una forma similar a la embelina. Los resultados obtenidos para el acoplamiento molecular de los compuestos aislados con el dominio BIR3 de XIAP (pdb 5C83) muestran que los ligandos evaluados se unen al mismo sitio de unión de la embelina, con energías de afinidad y modos de unión similares (Figura 4-9).

Interesantemente, tanto los compuestos evaluados como la embelina se ubicaron en la región comprendida por los bolsillos P1 a P4 del dominio BIR3 de XIAP, los cuales han sido ampliamente reportados como la región de unión específica en complejos estructurales de la proteína XIAP con su antagonista endógeno Smac<sup>25,32</sup>.



**Figura 4-9:** Modos de unión obtenidos por acoplamiento molecular de los compuestos embelina (naranja;  $\Delta G_{\text{unión}} = -5.61$  kcal/mol), erioquinol (verde;  $\Delta G_{\text{unión}} = -5.25$  kcal/mol), eriopodol A (púrpura;  $\Delta G_{\text{unión}} = -6.10$  kcal/mol) y gibbilimbol B (azul;  $\Delta G_{\text{unión}} = -5.14$  kcal/mol) en complejos con el dominio BIR3 de XIAP (pdb 5C83). Los residuos del dominio BIR3 que interactúan con los ligandos se muestran en líneas gruesas y los puentes de hidrógeno se muestran en líneas punteadas amarillas.

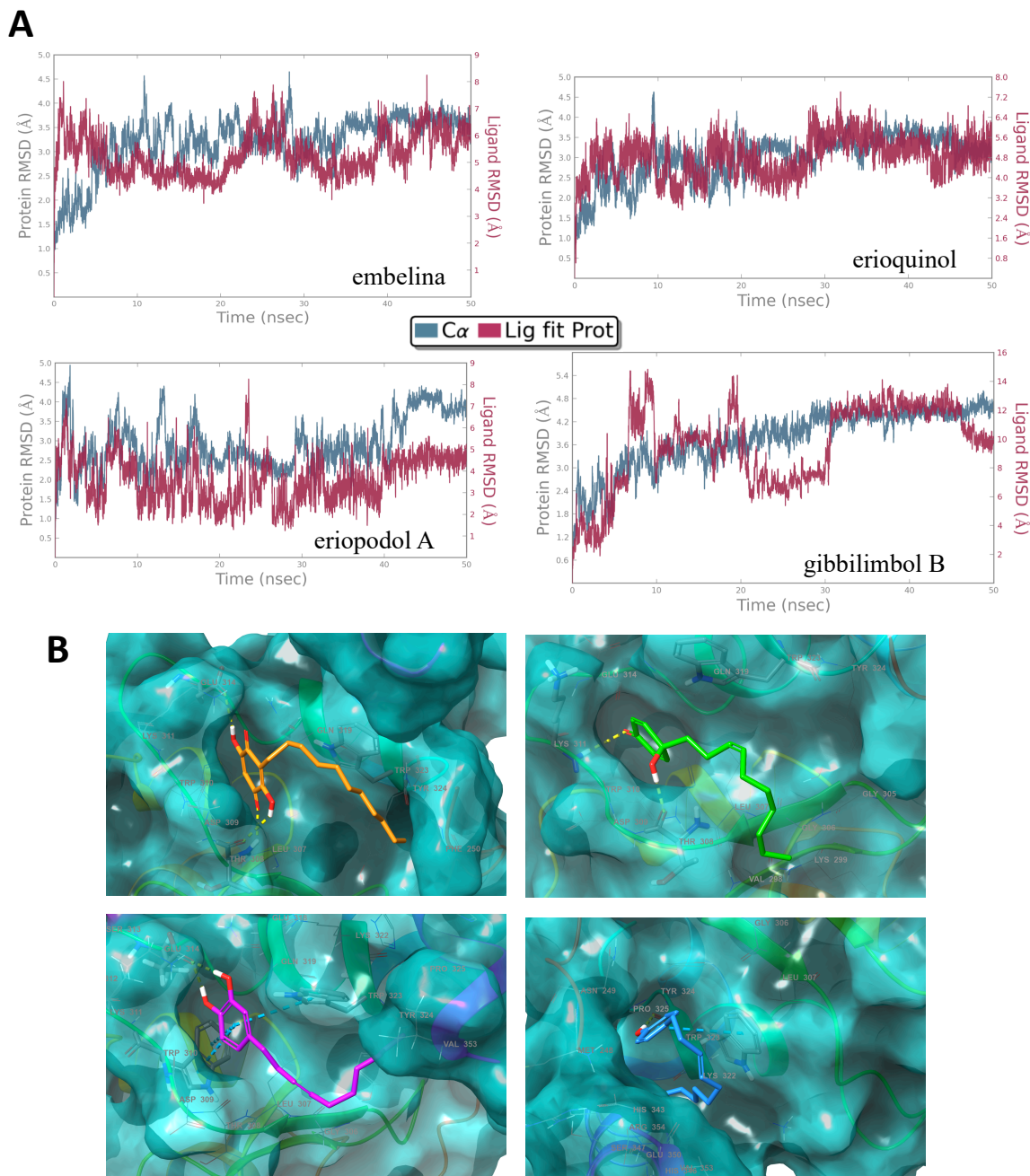
Se ha demostrado previamente, que los residuos GLY306, THR308, GLU314, TRP323 y TYR324 son fundamentales en la interacción de algunos ligandos como embelina, Smac, imitadores de Smac y moléculas pequeñas no peptidomiméticas, en diferentes complejos obtenidos de forma experimental con el dominio BIR3 de XIAP<sup>25,26,32,50,51</sup>. En efecto, los resultados obtenidos para el acoplamiento molecular de los compuestos fenólicos eriopodol A y gibbilimbol B, muestran la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los anillos fenólicos y los residuos LYS311 y GLU314, mientras que el erioquinol muestra una interacción un poco más fuerte mediante la formación de tres puentes de hidrógeno entre los residuos THR308, LYS322, TRP323 y los dos grupos oxigenados presentes en el anillo del erioquinol (Figura 4-9).

Por otro lado, las cadenas carbonadas de tipo alquílico de todos los ligandos evaluados presentaron interacciones hidrofóbicas muy similares, principalmente con los residuos GLY306, LEU307, TRP323 y TYR324.

Para determinar la estabilidad de los complejos proteína-ligando obtenidos por acoplamiento molecular entre los compuestos aislados y el dominio BIR3 de la proteína XIAP, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con una producción de 50 ns, en las cuales se observaron pequeñas variaciones (alrededor de 2 Å) en las trayectorias del RMSD para los complejos evaluados proteína-ligando (Figura 4-10), confirmando estos resultados la estabilidad de los complejos formados entre los compuestos y el dominio BIR3 de la proteína XIAP.

Aunque se observaron algunos cambios en el patrón de interacción con la proteína durante las trayectorias de simulación, los ligandos se mantuvieron en la misma región determinada por los bolsillos P1-P4 del dominio BIR3 de XIAP, manteniendo interacciones de puente de hidrógeno principalmente con los residuos THR308, ASP309, LYS311, GLU314 e interacciones hidrofóbicas principalmente con el TRP323 (Anexo A - Figura 5-45). Inclusive, los resultados obtenidos para la embelina tanto en el acoplamiento molecular como en las simulaciones de dinámica molecular coinciden con el patrón de unión experimental reportado para complejos entre la embelina y el dominio BIR3 de la proteína XIAP, donde se establece que las interacciones con el TRP323 son cruciales en el sitio de unión a la proteína. Estos resultados sugieren que los compuestos evaluados tienen la capacidad de formar un complejo altamente estable con el dominio BIR3 de la proteína XIAP.

La proteína XIAP puede ser considerada como el último salvavidas que tiene la célula antes de entrar en apoptosis, juega un papel importante en el desarrollo de quimiorresistencia y su sobreexpresión ha sido reportada tanto en líneas celulares de cáncer humano como en diferentes tumores obtenidos de pacientes con cáncer<sup>23,52,53</sup>, convirtiéndose esta proteína en un blanco molecular atractivo para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer<sup>26,54-56</sup>. Algunos reportes de compuestos naturales con actividad antagonista de la proteína XIAP, incluyen a compuestos como embelina, witaferina A, berberina y timoquinona, que han mostrado tener propiedades antitumorales asociadas a la inhibición de la proteína XIAP en diferentes líneas celulares de cáncer, incluyendo la línea celular MCF7<sup>57-60</sup>.



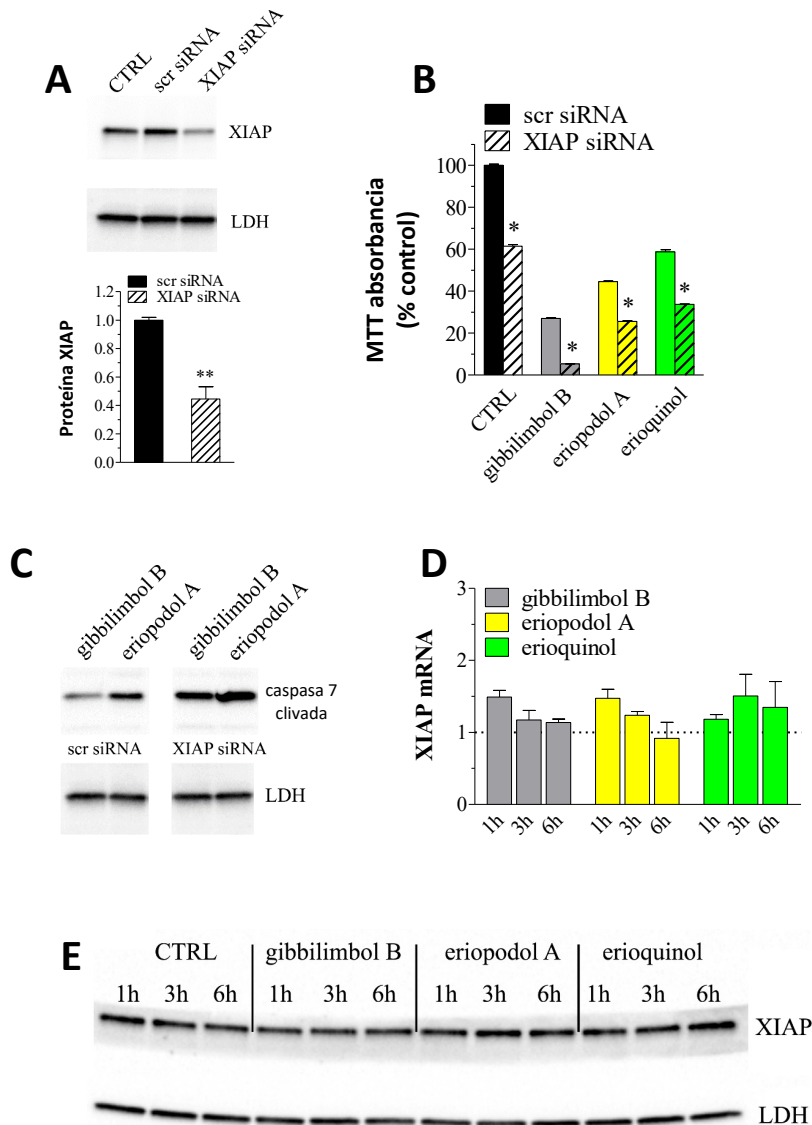
**Figura 4-10:** Dinámicas moleculares de los compuestos aislados de *P. eriopodon* con el dominio BIR3 de la proteína XIAP. **(A)** Variación del RMSD del ligando (rojo) y el dominio BIR3 de la proteína XIAP (azul) durante la simulación de la dinámica molecular (50 ns). **(B)** Modos de unión más estables obtenidos de las dinámicas moleculares para los compuestos embelina (naranja), erioquinol (verde), eriopodol A (púrpura) y gibbilimbol B (azul) en complejos con el dominio BIR3 de XIAP (pdb 5C83). Los residuos del dominio que interactúan con los ligandos se muestran en líneas gruesas, los puentes de hidrógeno se muestran en líneas punteadas amarillas y las interacciones de tipo apilamiento  $\pi$ - $\pi$  se muestran en líneas punteadas azules.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelado molecular de los compuestos aislados de *P. eriopodon* con el dominio BIR3 de XIAP y con el fin de establecer si las propiedades citotóxicas del erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B podrían ser similares a las reportadas para los compuestos mencionados anteriormente como inhibidores de la proteína XIAP, se decidió evaluar el papel de XIAP en la muerte celular inducida por los compuestos aislados de *P. eriopodon* en la línea celular MCF7.

Inicialmente, se realizó el silenciamiento de la proteína XIAP en células MCF7, para determinar si el modelo celular utilizado se afectaba de alguna manera por la eliminación de XIAP. Después de realizar el silenciamiento génico transitorio con un siRNA para XIAP a concentraciones de 50 nM por 24 h, se observó la reducción que los niveles de expresión de la proteína XIAP por wester blot hasta un 45 %, en comparación con el control (siRNA scramble) (Figura 4-11A), indicando una disminución parcial en la expresión de la proteína XIAP. Como resultado del silenciamiento se disminuyó cerca de un 40 % la viabilidad celular en comparación con el control siRNA scramble (Figura 4-11B); estos resultados han sido reportados previamente en las mismas líneas celulares<sup>61-63</sup>, confirmando la dependencia de XIAP para la supervivencia de las células MCF7 e indicando que los mecanismos de muerte en esta línea celular están bloqueados por XIAP. Por otro lado, cuando las células MCF7 silenciadas para XIAP se trataron por 6 h con los compuestos erioquinol (10 µg/mL), eriopodol A (30 µg/mL) y gibbilimbol B (30 µg/mL), se observó un incremento significativo del efecto citotóxico producido por cada uno de los tres compuestos, sugiriendo un mecanismo combinado de los compuestos con el silenciamiento específico de la proteína XIAP (Figura 4-11B).

Adicionalmente, si se tiene en cuenta que no se logró una disminución completa en la expresión de XIAP, inclusive cuando se utilizaron concentraciones de 100 nM de siRNA por 24 h, se observó de forma paralela un aumento en los niveles de caspasa 7 clivada y la pérdida total de la viabilidad celular (Anexo A - Figura 5-44B), sería posible sugerir que los compuestos indujeron un efecto citotóxico, a través de los niveles residuales de la proteína XIAP en las células transfectadas, aumentando de esta forma aún más la muerte celular. De hecho, el efecto aditivo del eriopodol A y gibbilimbol B, se vio reflejado en un fuerte aumento en la actividad de caspasa 7 clivada en las células MCF7 silenciadas para XIAP y tratadas con los compuestos fenólicos (Figura 4-11C). Sin embargo, aunque estos resultados no constituyen una evidencia biológica formal, la explicación más simple que se podría inferir de la acción combinada o el efecto aditivo entre los compuestos y el siRNA específico para XIAP, es que el efecto citotóxico

de los compuestos es mediado al menos en parte, por la proteína XIAP. Este efecto sobre el silenciamiento de XIAP con RNA interferente ya ha sido reportado como un factor de respuesta positiva de las células de cáncer de mama humano a diferentes agentes quimioterapéuticos como doxorubicina y etopósido, a los cuales las células MCF7 son resistentes<sup>53,61,64</sup>.



**Figura 4-11:** Proteína XIAP como blanco molecular de los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Análisis de western blot para XIAP en células MCF7 sin transfectar (CTRL) o transfectadas por 24 h con un siRNA control (scr siRNA) o específico para XIAP (50nM), utilizando LDH como control. La densitometría fue realizada sobre el siRNA control (scr siRNA). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **\*\**p* < 0.001** relativo al siRNA control (scr siRNA). **(B)** Las células MCF7 fueron transfectadas por 24 h con un siRNA control o específico para XIAP y posteriormente fueron tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30 µg/mL) y erioquinol (10 µg/mL), antes de realizar el ensayo del MTT. Los resultados son expresados ajustando la absorbancia del MTT con el control (scr siRNA), establecida como el 100 %. Los datos son



representativos de tres experimentos independientes.  $*p < 0.0001$  relativo al respectivo siRNA control (scr siRNA). **(C)** Análisis por western blot de caspasa 7 clivada en células MCF7 transfectadas por 24 h con un siRNA control (scr siRNA) o específico para XIAP (50nM) y posteriormente tratadas por 6 h en presencia de gibbilibol B y eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), utilizando LDH como control. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **(D)** PCR en tiempo real y **(E)** análisis por western blot de la expresión de mRNA y los niveles protéicos de XIAP, en células MCF7 tratadas a diferentes tiempos (1, 3 y 6 h) en ausencia (CTRL) o presencia de gibbilibol B/eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), utilizando como controles  $\beta$ -actina (PCR) y LDH (western blot). Los resultados de PCR son expresados de acuerdo al cambio relativo sobre el respectivo control, establecido como 1. Las imágenes y los datos son representativos de tres experimentos independientes.

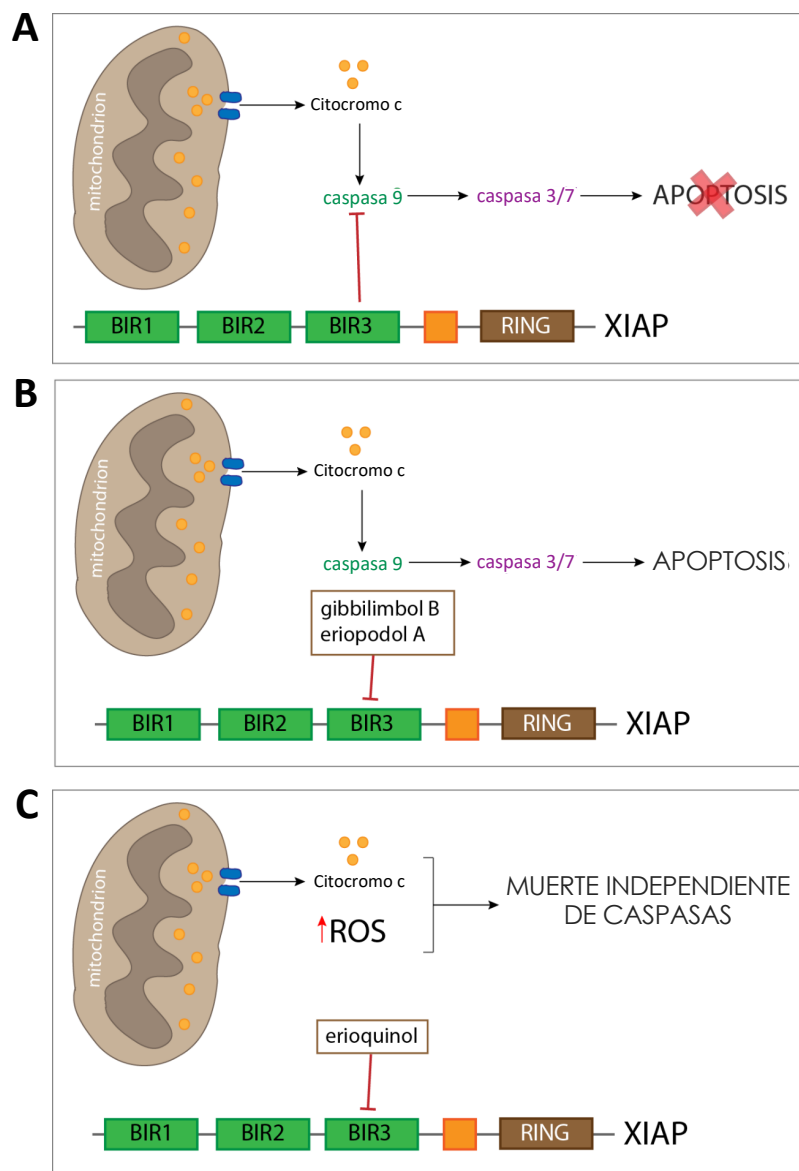
Por último, para establecer si el tratamiento con los compuestos inducía cambios en la expresión de la proteína XIAP en las células MCF7, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real y de western blot específicos para la proteína XIAP, utilizando tratamientos con erioquinol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), eriopodol A (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y gibbilibol B (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante tiempos de 1, 3 y 6 h. En las figuras 4-11D y 4-11E, se puede observar que los niveles de expresión de la proteína XIAP no presentaron grandes cambios durante los tiempos evaluados, ya que ninguno de los tratamientos produjo cambios significativos en los niveles de proteína o de mRNA. De forma general, estos resultados permiten establecer que el efecto citotóxico de los compuestos no induce alteraciones en la expresión de XIAP, pero son consistentes con un efecto antagónico sobre la actividad de la proteína XIAP, a través de la unión de los compuestos al dominio BIR3 de XIAP.

Una característica predominante del cáncer es que las células tumorales han desarrollado la capacidad de evadir la apoptosis por medio de diferentes alteraciones en sus mecanismos de muerte. De hecho, algunas estrategias terapéuticas para el descubrimiento de nuevos agentes antitumorales, consisten en identificar moléculas nuevas o conocidas que antagonicen los inhibidores endógenos de apoptosis, miembros de las familias de las IAPs o de BCL-2<sup>23,26,65,66</sup>.

En particular, XIAP es considerada como el inhibidor más potente de la apoptosis y como el último salvavidas que tiene la célula antes de entrar en apoptosis, ya que bloquea el funcionamiento tanto de caspasas iniciadoras (caspasa 9) como efectoras (caspasas 3 y 7) con el único objetivo de evitar la muerte celular. Esta interacción entre la proteína XIAP y las caspasas es mediada en su mayoría por el dominio BIR3 de XIAP y por lo tanto, cualquier molécula que pueda unirse al sitio activo del dominio BIR3, puede imitar la acción de Smac e inhibir la interacción entre XIAP y las caspasas<sup>24,26</sup>. Sin embargo, la versatilidad de la proteína XIAP no se limita únicamente a inhibir la apoptosis, ya que también se ha descrito su

participación en algunos procesos inflamatorios y en otros tipos de muerte celular, incluyendo la dependiente de la autofagia y la necroptosis<sup>49,67-69</sup>, haciendo de XIAP una proteína muy importante que puede participar en múltiples vías celulares.

De forma general, en este capítulo se realizó la descripción preliminar de los mecanismos biológicos inducidos por los compuestos eriopodol A, gibbilimbol B y erioquinol en células tumorales, la cual se resume mediante el esquema mostrado en la Figura 4-12.



**Figura 4-12:** Esquema general de los mecanismos de muerte inducidos en células tumorales por los compuestos aislados de *P. eriopodon*. **(A)** Evasión de apoptosis como una de las principales características del cáncer, promovida por sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, en este caso por la proteína XIAP que se une a la caspasa 9 clivada por medio de su dominio BIR3 e impidiendo que la

célula entre en proceso de apoptosis. Los estudios *in silico* realizados en este trabajo, permiten sugerir que los compuestos eriopodol A, gibbilimbol B y erioquinol se unen al dominio BIR3 de la proteína XIAP, causando la muerte celular por medio de mecanismos tanto apoptóticos como independientes de caspasas. **(B)** Los compuestos gibbilimbol B y eriopodol A producen una respuesta proapoptótica en la célula, induciendo disfunción mitocondrial, liberación de citocromo c y posterior activación de caspasas iniciadoras (caspasa 9) y efectoras (caspasa 7). **(C)** El compuesto erioquinol produce una respuesta similar a nivel mitocondrial, pero sin la activación de caspasas, induciendo una muerte celular independiente de caspasas y caracterizada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citoplasma celular.

Los resultados obtenidos muestran claramente la importancia y el potencial farmacológico que tienen los compuestos aislados de la especie vegetal *P. eriopodon*, no solamente para compuestos de tipo alquenilfenol, sino también para estructuras similares de tipo quinol, sustituidas en la posición 4 con un grupo alquenilo. Aunque los tres compuestos producen efectos similares sobre la mitocondria e inducen la muerte en células tumorales, dos de ellos (eripodol A y gibbilimbol B) actúan por mecanismos dependientes de activación de caspasas para inducir apoptosis, mientras que el compuesto restante (erioquinol), induce muerte celular por medio de mecanismos no apoptóticos independientes de caspasas. Interesantemente, el modelado molecular y algunos ensayos biológicos realizados sobre la proteína antiapoptótica XIAP, sugieren que los tres compuestos podrían unirse al dominio BIR3 de XIAP y tener efectos antagonistas sobre esta proteína que podría regular no solamente procesos de apoptosis, sino que también podría controlar la muerte celular independiente de caspasas.

Recientemente, la muerte celular independiente de caspasas ha sido considerada como una nueva estrategia farmacológica para el tratamiento del cáncer, en la que, de forma simultánea, se pueden atacar los tumores y a su vez, aumentar la respuesta inflamatoria<sup>70</sup>; la proteína XIAP en este contexto se convierte en un blanco molecular aún más atractivo, ya que puede participar en diferentes vías de señalización involucradas tanto en procesos de inflamación, como en procesos de muerte celular dependientes e independientes de caspasas; y abriendo una puerta muy importante a la participación simultánea de la proteína XIAP en diferentes vías celulares que pueden afectar de forma considerable el equilibrio entre la vida y la muerte de las células tumorales.

## 4.4 Conclusiones

Los compuestos fenólicos gibbilimbol B y eriopodol A producen una respuesta proapoptótica en la célula, induciendo disfunción mitocondrial, liberación de citocromo c y posterior activación de caspasas iniciadoras (caspasa 9) y efectoras (caspasa 7). El erioquinol, aunque tiene una respuesta similar a nivel mitocondrial, no produce la activación de caspasas, induciendo una muerte celular no apoptótica independiente de caspasas y caracterizada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citoplasma celular, produciendo efectos similares a los reportados para una forma de muerte celular denominada oxeiptosis.

Los estudios *in silico* mostraron que los tres compuestos pueden unirse al dominio BIR 3 de la proteína antiapoptótica XIAP en el mismo lugar de unión de su inhibidor endógeno Smac y del compuesto natural embelina, reportado previamente como un inhibidor de la proteína XIAP. Sin embargo, aunque ninguno de los tres compuestos produjo cambios significativos en los niveles de la proteína XIAP y se descartó la posibilidad de que los compuestos puedan regular la expresión de esta proteína en las líneas tumorales evaluadas, los resultados obtenidos por medio de acoplamiento molecular y del silenciamiento de XIAP en las células MCF7, son consistentes con un efecto antagónico sobre esta proteína, por medio de la unión de los compuestos al dominio BIR3 de XIAP.

Aunque algunos aspectos están por ser dilucidados completamente, los resultados obtenidos en este capítulo permitieron describir el potencial biológico que tienen los compuestos eriopodol A y gibbilimbol B como inhibidores de la proteína XIAP en la inducción de apoptosis en células tumorales; y adicionalmente, por medio del erioquinol, se presenta un claro ejemplo de cómo el interés farmacológico del dominio BIR3 de la proteína XIAP puede ir más allá de simplemente inhibir la apoptosis y extender su influencia en la modulación de diferentes vías de señalización, como en los procesos de muerte celular independiente de caspasas.

## 4.5 Bibliografía

- (1) Shen, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell* **2015**, *163* (6), 1297–1300.
- (2) Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (2), 111–129.
- (3) Guerra, A. R.; Duarte, M. F.; Duarte, I. F. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived

- Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (41), 10663–10658.
- (4) Carocho, M.; Ferreira, I. The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2013**, No. 13, 1236–1258.
- (5) Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* **2018**, *5* (93), 1–16.
- (6) Jafari, S.; Saeidnia, S.; Abdollahi, M. Role of Natural Phenolic Compounds in Cancer Chemoprevention via Regulation of the Cell Cycle. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**.
- (7) Diaz, L. E.; Munoz, D. R.; Prieto, R. E.; Cuervo, S. A.; Gonzalez, D. L.; Guzman, J. D.; Bhakta, S. Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of *Piper imperiale*. *Molecules* **2012**, *17* (4), 4142–4157.
- (8) Wang, Y.-H.; Lee, K.-H.; Long, C.-L.; Morris-Natschke, S.; Niu, H.-M.; Yang, J. Anticancer Principles from Medicinal *Piper* Plants. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4* (1), 8–16.
- (9) Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Gupta, S.; Talwar, S.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Azim, A.; Malhotra, S.; Kumar, N.; Jain, R.; et al. Polyphenols and Alkaloids from *Piper* Species. *Phytochemistry* **1998**, *49* (4), 1069–1078.
- (10) Valdivia, C.; Marquez, N.; Eriksson, J.; Vilaseca, A.; Muñoz, E.; Sterner, O. Bioactive Alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16* (7), 4120–4126.
- (11) Ali, I.; Satti, N. K.; Dutt, P.; Prasad, R.; Khan, I. A. Hydroxychavicol: A Phytochemical Targeting Cutaneous Fungal Infections. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (37867), 1–20.
- (12) Mgbeahuruike, E. E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H.; Holm, Y. Bioactive Compounds from Medicinal Plants: Focus on *Piper* Species. *South African J. Bot.* **2017**, *112*, 54–69.
- (13) Sanubol, A.; Chaveerach, A.; Tanee, T.; Sudmoon, R. Pre-Clinical Evaluation of Extracts and Essential Oils from Betel-like Scent *Piper* Species Identified Potential Cancer Treatment. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **2017**, *14* (1), 89–102.
- (14) Rekha, V. P. B.; Kollipara, M.; Srinivasa Gupta, B. R. S. S.; Bharath, Y.; Pulicherla, K. K. A Review on *Piper betle* L.: Nature's Promising Medicinal Reservoir. *Am. J. Ethnomedicine* **2014**, *1* (5), 276–289.
- (15) Durant-Archibold, A. A.; Santana, A. I.; Gupta, M. P. Ethnomedical Uses and Pharmacological Activities of Most Prevalent Species of Genus *Piper* in Panama: A Review. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *217*, 63–82.
- (16) Gundala, S. R.; Yang, C.; Mukkavilli, R.; Paranjpe, R.; Brahmbhatt, M.; Pannu, V.; Cheng,

- A.; Reid, M. D.; Aneja, R. Hydroxychavicol, a Betel Leaf Component, Inhibits Prostate Cancer through ROS-Driven DNA Damage and Apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *280*, 86–96.
- (17) Benfica, P. L.; Ávila, R. I. de; Rodrigues, B. D. S.; Cortez, A. P.; Batista, A. C.; Gaeti, M. P. N.; Lima, E. M.; Rezende, K. R.; Valadares, M. C. 4-Nerolidylcatechol: Apoptosis by Mitochondrial Mechanisms with Reduction in Cyclin D1 at G0/G1 Stage of the Chronic Myelogenous K562 Cell Line. *Pharm. Biol.* **2017**, *55* (1), 1899–1908.
- (18) Piska, K.; Gunia-Krzyżak, A.; Koczurkiewicz, P.; Wójcik-Pszczola, K.; Pękala, E. Piperlongumine (Piplartine) as a Lead Compound for Anticancer Agents – Synthesis and Properties of Analogues: A Mini-Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 13–20.
- (19) Orjala, J.; Mian, P.; Rali, T.; Sticher, O. Gibbilibols A-D, Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilibum*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (7), 939–941.
- (20) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
- (21) Fulda, S.; Vucic, D. Targeting IAP Proteins for Therapeutic Intervention in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (4), 331–331.
- (22) Lalaoui, N.; Vaux, D. L. Recent Advances in Understanding Inhibitor of Apoptosis Proteins. *F1000Research*. 2018, pp 1–15.
- (23) Rathore, R.; McCallum, J. E.; Varghese, E.; Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Overcoming Chemotherapy Drug Resistance by Targeting Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs). *Apoptosis* **2017**, *22* (7), 898–919.
- (24) Schimmer, a D.; Dalili, S.; Batey, R. a; Riedl, S. J. Targeting XIAP for the Treatment of Malignancy. *Cell Death Differ.* **2006**, *13* (2), 179–188.
- (25) Tamanini, E.; Buck, I. M.; Chessari, G.; Chiarparin, E.; Day, J. E. H.; Frederickson, M.; Griffiths-Jones, C. M.; Hearn, K.; Heightman, T. D.; Iqbal, A.; et al. Discovery of a Potent Non-Peptidomimetic, Small-Molecule Antagonist of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (CIAP1) and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (11), 4611–4625.
- (26) Cong, H.; Xu, L.; Wu, Y.; Qu, Z.; Bian, T.; Zhang, W.; Xing, C.; Zhuang, C. Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Antagonists in Anticancer Agent Discovery: Current Status and Perspectives. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (12), 5750–5772.
- (27) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National

- Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- (28) Bizzozero, L.; Cazzato, D.; Cervia, D.; Assi, E.; Simbari, F.; Pagni, F.; De Palma, C.; Monno, A.; Verdelli, C.; Querini, P. R.; et al. Acid Sphingomyelinase Determines Melanoma Progression and Metastatic Behaviour via the Microphthalmia-Associated Transcription Factor Signalling Pathway. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 507–520.
- (29) Perrotta, C.; Buonanno, F.; Zecchini, S.; Giavazzi, A.; Proietti Serafini, F.; Catalani, E.; Guerra, L.; Belardinelli, M. C.; Picchietti, S.; Fausto, A. M.; et al. Climacostol Reduces Tumour Progression in a Mouse Model of Melanoma via the P53-Dependent Intrinsic Apoptotic Programme. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (27281), 1–14.
- (30) Assi, E.; Cervia, D.; Bizzozero, L.; Capobianco, A.; Pambianco, S.; Morisi, F.; De Palma, C.; Moscheni, C.; Pellegrino, P.; Clementi, E.; et al. Modulation of Acid Sphingomyelinase in Melanoma Reprogrammes the Tumour Immune Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015* (130482), 1–13.
- (31) Vantaggiato, C.; Castelli, M.; Giovarelli, M.; Orso, G.; Bassi, M. T.; Clementi, E.; De Palma, C. The Fine Tuning of Drp1-Dependent Mitochondrial Remodeling and Autophagy Controls Neuronal Differentiation. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13* (120), 1–20.
- (32) Chessari, G.; Buck, I. M.; Day, J. E. H.; Day, P. J.; Iqbal, A.; Johnson, C. N.; Lewis, E. J.; Martins, V.; Miller, D.; Reader, M.; et al. Fragment-Based Drug Discovery Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins: Discovery of a Non-Alanine Lead Series with Dual Activity Against CIAP1 and XIAP. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (16), 6574–6588.
- (33) Pfisterer, P. H.; Wolber, G.; Efferth, T.; Rollinger, J. M.; Stuppner, H. Natural Products in Structure-Assisted Design of Molecular Cancer Therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16* (15), 1718–1741.
- (34) Muñoz, D.; Sandoval-Hernandez, A.; Delgado, W.; Arboleda, G.; Cuca, L. In Vitro Anticancer Screening of Colombian Plants from Piper Genus (Piperaceae). *J. Pharmacogn. Phyther.* **2018**, *10* (9), 174–181.
- (35) May, J. E.; Donaldson, C.; Gynn, L.; Ruth Morse, H. Chemotherapy-Induced Genotoxic Damage to Bone Marrow Cells: Long-Term Implications. *Mutagenesis* **2018**, *33*, 241–251.
- (36) Wang, Y.; Probin, V.; Zhou, D. Cancer Therapy-Induced Residual Bone Marrow Injury: Mechanisms of Induction and Implication for Therapy. *Curr. Cancer Ther. Rev.* **2006**, *2* (3), 271–279.
- (37) Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.*

- 2018**, *80*, 50–64.
- (38) Tait, S. W. G.; Green, D. R. Caspase-Independent Cell Death: Leaving the Set without the Final Cut. *Oncogene* **2008**, *27*, 6452–6461.
- (39) Ye, J.; Zhang, R.; Wu, F.; Zhai, L.; Wang, K.; Xiao, M.; Xie, T.; Sui, X. Non-Apoptotic Cell Death in Malignant Tumor Cells and Natural Compounds. *Cancer Lett.* **2018**, *420*, 210–227.
- (40) Galluzzi, L.; Kepp, O.; Chan, F. K.-M.; Kroemer, G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2017**, *12* (4), 1–28.
- (41) Green, D. R. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell* **2019**, *177*, 1094–1107.
- (42) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D. W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541.
- (43) Holze, C.; Michaudel, C.; MacKowiak, C.; Haas, D. A.; Benda, C.; Hubel, P.; Pennemann, F. L.; Schnepf, D.; Wettmarshausen, J.; Braun, M.; et al. Oxeiptosis, a ROS-Induced Caspase-Independent Apoptosis-like Cell-Death Pathway Article. *Nat. Immunol.* **2018**, *19* (2), 130–140.
- (44) Chai, J.; Shiozaki, E.; Srinivasula, S. M.; Wu, Q.; Dataa, P.; Alnemri, E. S.; Shi, Y. Structural Basis of Caspase-7 Inhibition by XIAP. *Cell* **2001**, *104*, 769–780.
- (45) Shiozaki, E. N.; Chai, J.; Rigotti, D. J.; Riedl, S. J.; Li, P.; Srinivasula, S. M.; Alnemri, E. S.; Fairman, R.; Shi, Y. Mechanism of XIAP-Mediated Inhibition of Caspase-9. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 519–527.
- (46) Suzuki, Y.; Nakabayashi, Y.; Nakata, K.; Reed, J. C.; Takahashi, R. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Inhibits Caspase-3 and -7 in Distinct Modes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (29), 27058–27063.
- (47) Lewis, J.; Burstein, E.; Reffey, S. B.; Bratton, S. B.; Roberts, A. B.; Duckett, C. S. Uncoupling of the Signaling and Caspase-Inhibitory Properties of X-Linked Inhibitor of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (10), 9023–9029.
- (48) Wicki, S.; Gurzeler, U.; Wong, W. W. L.; Jost, P. J.; Bachmann, D.; Kaufmann, T. Loss of XIAP Facilitates Switch to TNF $\alpha$ -Induced Necroptosis in Mouse Neutrophils. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, 1–13.
- (49) Yabal, M.; Jost, P. J. XIAP as a Regulator of Inflammatory Cell Death: The TNF and RIP3



- Angle. *Mol. Cell. Oncol.* **2015**, *2* (1), 1–2.
- (50) Nikolovska-Coleska, Z.; Xu, L.; Hu, Z.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Wang, R.; Fang, X.; Guo, R.; Zhang, M.; et al. Discovery of Embelin as a Cell-Permeable, Small-Molecular Weight Inhibitor of XIAP through Structure-Based Computational Screening of a Traditional Herbal Medicine Three-Dimensional Structure Database. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (10), 2430–2440.
- (51) Johnson, C. N.; Ahn, J. S.; Buck, I. M.; Chiarparin, E.; Day, J. E. H.; Hopkins, A.; Howard, S.; Lewis, E. J.; Martins, V.; Millemaggi, A.; et al. A Fragment-Derived Clinical Candidate for Antagonism of X-Linked and Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins: 1-(6-[(4-Fluorophenyl)methyl]-5-(Hydroxymethyl)-3,3-Dimethyl-1 H,2 H,3 H-Pyrrolo[3,2-b]Pyridin-1-Yl)-2-[(2 R,5 R)-5-Methyl-2-[(3R)-3-Methylmor. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (16), 7314–7329.
- (52) Kashkar, H. X-Linked Inhibitor of Apoptosis: A Chemoresistance Factor or a Hollow Promise. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (18), 4496–4503.
- (53) Wang, S.; Bai, L.; Lu, J. Targeting Inhibitors of Apoptosis Proteins ( IAPs ) For New Breast Cancer Therapeutics. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2012**, *17*, 217–228.
- (54) Schimmer, A. D.; Welsh, K.; Pinilla, C.; Wang, Z.; Krajewska, M.; Bonneau, M. J.; Pedersen, I. M.; Kitada, S.; Scott, F. L.; Bailly-Maitre, B.; et al. Small-Molecule Antagonists of Apoptosis Suppressor XIAP Exhibit Broad Antitumor Activity. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 25–35.
- (55) Obexer, P.; Ausserlechner, M. J. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein – a Critical Death Resistance Regulator and Therapeutic Target for Personalized Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **2014**, *4* (197), 1–9.
- (56) Fulda, S. Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (22), 5030–5036.
- (57) Motaghed, M.; Al-Hassan, F. M.; Hamid, S. S. Cellular Responses with Thymoquinone Treatment in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Pharmacognosy Res.* **2013**, *5* (3), 200–206.
- (58) Barzegar, E.; Fouladdel, S.; Komeili Movahhed, T.; Atashpour, S.; Ghahremani, M. H.; Ostad, S. N.; Azizi, E. Effects of Berberine on Proliferation, Cell Cycle Distribution and Apoptosis of Human Breast Cancer T47D and MCF7 Cell Lines. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2015**, *18*, 334–342.
- (59) Hahm, E. R.; Singh, S. V. Withaferin A-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells

- Is Associated with Suppression of Inhibitor of Apoptosis Family Protein Expression. *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 101–108.
- (60) Paramasivam, A.; Sambantham, S.; Shabnam, J.; Vijayashree, J.; Jayaraman, G. Anti-Cancer Effects of Thymoquinone in Mouse Neuroblastoma ( Neuro-2a ) Cells through Caspase-3 Activation with down-Regulation of XIAP. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213* (2), 151–159.
- (61) Sambade, C.; Helena, M.; Lima, R. T.; Martins, M. Specific Downregulation of Bcl-2 and XIAP by RNAi Enhances the Effects of Chemotherapeutic Agents in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Cancer Gene Ther.* **2004**, *11*, 309–316.
- (62) Sensintaffar, J.; Scott, F. L.; Peach, R.; Hager, J. H. XIAP Is Not Required for Human Tumor Cell Survival in the Absence of an Exogenous Death Signal. *BMC Cancer* **2010**, *10* (11), 1–13.
- (63) Zhang, Y.; Wang, Y.; Gao, W.; Zhang, R.; Han, X.; Jia, M.; Guan, W. Transfer of SiRNA against XIAP Induces Apoptosis and Reduces Tumor Cells Growth Potential in Human Breast Cancer in Vitro and in Vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* **2006**, *96*, 267–277.
- (64) Foster, F. M.; Owens, T. W.; Tanianis-Hughes, J.; Clarke, R. B.; Brennan, K.; Bundred, N. J.; Streuli, C. H. Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins in Combination with ErbB Antagonists in Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2009**, *11* (3), 1–13.
- (65) Montero, J.; Letai, A. Why Do BCL-2 Inhibitors work and Where Should We Use Them in the Clinic? *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 56–64.
- (66) Delbridge, A. R. D.; Strasser, A. The BCL-2 Protein Family, BH3-Mimetics and Cancer Therapy. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1071–1080.
- (67) Huang, X.; Wu, Z.; Mei, Y.; Wu, M. XIAP Inhibits Autophagy via XIAP-Mdm2-P53 Signalling. *EMBO J.* **2013**, *32* (16), 2204–2216.
- (68) Merlo, P.; Cecconi, F. XIAP : Inhibitor of Two Worlds. *EMBO J.* **2013**, *32* (16), 2187–2188.
- (69) Goncharov, T.; Hedayati, S.; Mulvihill, M. M.; Izrael-Tomasevic, A.; Zobel, K.; Jeet, S.; Fedorova, A. V.; Eidenschenk, C.; DeVoss, J.; Yu, K.; et al. Disruption of XIAP-RIP2 Association Blocks NOD2-Mediated Inflammatory Signaling. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 551–565.
- (70) Giampazolias, E.; Zunino, B.; Dhayade, S.; Bock, F.; Cloix, C.; Cao, K.; Roca, A.; Lopez, J.; Ichim, G.; Proïcs, E.; et al. Mitochondrial Permeabilization Engages NF-KB-Dependent Anti-Tumour Activity under Caspase Deficiency. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19* (9), 1116–1129.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

El screening de citotoxicidad en células tumorales realizado a 28 extractos etanólicos obtenidos de diferentes especies del género *Piper*, permitió establecer que las tres especies vegetales con mayor potencial citotóxico fueron *P. eriopodon*, *P. bogotense* y *P. cumanense*. El efecto citotóxico más potente fue obtenido con los extractos etanólicos de hojas, madera e inflorescencias de *P. eriopodon*, especialmente con el extracto de las hojas, que alcanzó valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 20 µg/mL frente a las líneas celulares de cáncer A547 (pulmón), PC3 (próstata) y MDAMB-231 (mama).

El estudio fitoquímico de las fracciones más activas del extracto etanólico de hojas de *P. eriopodon*, condujo al aislamiento y caracterización estructural de nueve compuestos derivados de alquenilfenol (**1** a **9**). El compuesto **1** fue identificado como gibbilimbol B, aislado inicialmente de la planta medicinal *P. gibbilimum*, mientras que los otros compuestos se reportan por primera vez en la literatura, constituyendo un nuevo aporte al estudio fitoquímico del género *Piper*. La elucidación estructural de los compuestos **2**, **4** y **5** permitió establecer que corresponden a tres alquenilfenoles a los que se les asignó el nombre común de eriopodoles A-C, los compuestos **6**, **7**, **8** y **9** corresponden a cuatro dímeros de alquenilfenol que se denominaron eriopodoles D-G y el compuesto **3** corresponde un quinol sustituido con una cadena alquílica insaturada, al que se le asignó el nombre común de erioquinol.

El reporte de los dímeros de alquenilfenol denominados eriopodoles D-G constituye un nuevo aporte a nivel quimiotaxonómico del género *Piper*, debido a que *P. eriopodon* es la segunda especie del género en la que se reporta el aislamiento de este tipo de compuestos, los cuáles únicamente se habían reportado anteriormente en *P. sarmentosum*.

Se determinó el efecto citotóxico de todos los compuestos aislados frente a células de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama), encontrando que los nueve compuestos poseen propiedades citotóxicas, siendo los compuestos más activos el erioquinol, seguido del

eriopodol A y el gibbilimbol B. Aunque los alquenilfenoles aislados en este trabajo comparten características estructurales como la insaturación en C-3' con geometría de tipo *E*; al comparar su actividad citotóxica con la reportada para alquenilfenoles similares como el climacostol o el sarmentosumol B que tienen insaturación en C-2' con geometría de tipo *Z*, es evidente que tanto el tipo de sustitución del anillo aromático como la geometría y posición de la insaturación en la cadena alquílica son determinantes en la presencia o ausencia de actividad citotóxica.

Los tres compuestos con mayor potencial antitumoral fueron el erioquinol, seguido del eriopodol A y el gibbilimbol B. Aunque sus efectos antitumorales fueron demostrados en diferentes líneas celulares de cáncer humano como U373 (glioblastoma), MCF7 (mama), A549 (pulmón) y PC3 (próstata), su citotoxicidad también fue demostrada en células HUVEC (células endoteliales de vena de cordón umbilical humano) y en la línea celular no tumoral de mama humana MCF10. El hecho de que estos compuestos tengan efectos citotóxicos en estas últimas dos líneas celulares no transformadas y altamente proliferantes, sugiere que sus efectos citotóxicos no están correlacionados necesariamente con las células cancerígenas. Sin embargo, aún queda por establecer si su efecto citotóxico está relacionado directamente con los tipos de células que proliferan rápidamente, tal y como sucede con otros agentes antitumorales utilizados en quimioterapia.

El compuesto con el efecto citotóxico más potente frente a células de cáncer humano U373 (glioblastoma), MCF7 (mama), A549 (pulmón) y PC3 (próstata) fue el erioquinol, un quinol sustituido en la posición 4 con una cadena alquílica de 10 carbonos que posee una insaturación de tipo *Z* en C-3'. Este compuesto natural aislado de *P. eriopodon* reúne diferentes características estructurales de potentes agentes antitumorales, como es el caso de los quinoles sustituidos en la posición 4 con grupos arilo, así como de quinonas y fenoles sustituidos con cadenas alquílicas como la embelina y el climacostol, razón por lo cual puede ser considerado como un excelente candidato para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

El estudio del mecanismo de muerte inducida por los compuestos erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B en las líneas celulares de cáncer humano U373 (glioblastoma) y MCF7 (mama), permitió establecer que los compuestos eriopodol A y gibbilimbol B son inductores de apoptosis, por medio de disfunción mitocondrial, liberación de citocromo c y posterior activación de caspasas 9 y 7. Por otro lado, se determinó que el mecanismo de muerte celular producido por el erioquinol es independiente de procesos de muerte como apoptosis,

necroptosis y ferroptosis, ya que este compuesto induce un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas, que se caracteriza por disfunción mitocondrial, seguida de la liberación de citocromo c y una fuerte acumulación de ROS en el citoplasma celular.

Los estudios de acoplamiento y dinámica molecular realizados con el dominio BIR3 de la proteína antiapoptótica XIAP, permitieron establecer que los compuestos erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B pueden formar un complejo estable con XIAP, ya que son capaces de unirse a su dominio BIR3 en el mismo sitio de unión de su antagonista endógeno Smac y de compuestos naturales como la embelina, la cual ha sido ampliamente reportada como un antagonista de la proteína XIAP, sugiriendo estos resultados que los compuestos aislados de *P. eriopodon* podrían ser capaces de inhibir la función antiapoptótica de la proteína XIAP.

El silenciamiento de XIAP en células MCF7, produjo una reducción del 40 % en la viabilidad celular en comparación con el control, confirmando la dependencia de XIAP para la supervivencia de las células MCF7 e indicando que los mecanismos de muerte en esta línea celular están bloqueados por XIAP. Adicionalmente, el tratamiento con los compuestos erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B en las células MCF7 silenciadas para XIAP, mostró un incremento significativo tanto del efecto citotóxico, como de la activación de caspasa 7 clivada, sugiriendo un efecto combinado de los compuestos con el silenciamiento específico de la proteína XIAP. Sin embargo, aunque ninguno de los tratamientos realizados con erioquinol, eriopodol A o gibbilimbol B en células MCF7 produjo cambios significativos en los niveles de la proteína XIAP y se descartó la posibilidad de que los compuestos puedan regular la expresión de esta proteína, los resultados obtenidos por medio de acoplamiento molecular y del silenciamiento de XIAP, son consistentes con un efecto antagónico sobre esta proteína, por medio de la unión de los compuestos al dominio BIR3 de XIAP.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron demostrar que los alquenilfenoles aislados de *P. eriopodon* poseen un gran potencial biológico y se pueden considerar como excelentes candidatos en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales. Los compuestos erioquinol, eriopodol A y gibbilimbol B pueden activar rutas de muerte celular tanto dependientes como independientes de caspasas e inducen un efecto antagónico sobre la proteína XIAP, sugiriendo adicionalmente que esta proteína también podría influir en la modulación de procesos de muerte celular independiente de caspasas. Estos compuestos comparten características químicas estructurales que vale la pena correlacionar con su gran

potencial farmacológico, con el fin de establecer si más adelante pueden ser utilizados como prototipos en el diseño de nuevos fármacos en la lucha contra el cáncer.

Los compuestos naturales obtenidos de las plantas constituyen una fuente importante para el descubrimiento de nuevos agentes antitumorales, debido a que son los mismos mecanismos de defensa de las plantas los encargados de producir diferentes sustancias con efectos citotóxicos. Por esta razón y aprovechando la amplia biodiversidad y distribución del género *Piper* en nuestro país, se recomienda continuar con la búsqueda de alquenilfenoles y alquilquinonas, los cuales podrían jugar un papel fundamental en el descubrimiento de nuevas sustancias con actividad antitumoral.

Aunque *P. eriopodon* fue la especie vegetal que mostró tener el mayor potencial citotóxico en el screening de citotoxicidad, los extractos etanólicos de *P. bogotense* y *P. cumanense* también presentaron valores de  $IC_{50}$  por debajo de 30  $\mu\text{g/mL}$  frente a células de cáncer de pulmón (A549), próstata (PC3) y mama (MDA-MB-231), por lo que se recomienda realizar estudios fitoquímicos a estas dos especies, con el fin de encontrar el tipo de metabolitos responsables de su efecto citotóxico.

Se recomienda realizar ensayos adicionales de citotoxicidad para los compuestos aislados en diferentes líneas celulares, con el fin de poder establecer si tienen selectividad por algún tipo de cáncer y poder establecer si su efecto citotóxico está o no relacionado únicamente con las células que proliferan más rápidamente.

Se recomienda realizar estudios biológicos adicionales que permitan determinar completamente el mecanismo de muerte inducido por el erioquinol, de tal forma que se pueda establecer si tiene o no relación con mecanismos de muerte celular independiente de caspasas y que son mediados por la producción de especies reactivas de oxígeno como la oxeiptosis.

Finalmente, se recomienda realizar transformaciones químicas a los compuestos obtenidos con el fin de potencializar su actividad biológica y tener información suficiente que permita realizar estudios computacionales de estructura-actividad donde se incluyan también otros compuestos similares como el climacostol y la embelina, a los cuales ya se les ha comprobado su efectividad como potentes agentes antitumorales y como antagonistas de la proteína XIAP.

## Producción Académica y participación en eventos

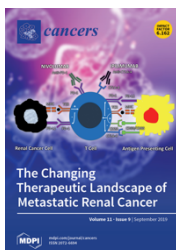
### Artículos Publicados



Muñoz, D., Cuca, L. *Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP)*. **Revista Colombiana de Cancerología**, 2016, 20(3), 124-134.



Muñoz, D., Sandoval-Hernandez, A. G., Delgado, W. A., Arboleda, G. H., & Muñoz, D. *In vitro anticancer screening of Colombian plants from Piper genus (Piperaceae)*. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, 2018, 10(9), 174-181.



Muñoz, D.; Bruccoli, M.; Zecchini, S.; Sandoval-Hernandez, A.; Arboleda, G.; Lopez-Vallejo, F.; Delgado, W.; Giovarelli, M.; Coazzoli, M.; Catalani, E.; Palma, C.D.; Perrotta, C.; Cuca, L.; Clementi, E.; Cervia, D. *XIAP as a Target of New Small Organic Natural Molecules Inducing Human Cancer Cell Death*. **Cancers**, 2019, 11, 1336.

### Artículos próximos a someter

Muñoz, D.; Sandoval-Hernandez, A.; Cuca, L.; Clementi, E.; Cervia, D. *Natural compounds as XIAP inhibitors*. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 2020.

Muñoz, D.; Viasus, C.; Sandoval-Hernandez, A.; Cuca, L.; Cervia, D. *Absolute configuration of eriopodol D, a new cytotoxic dimeric alkenylphenol from P. eriopodon*. **Journal of Natural Products**, 2020.

Muñoz, D.; Sandoval-Hernandez, A.; Cuca, L.; Cervia, D. *Eriopodols E-G, new cytotoxic dimeric alkenylphenols from P. eriopodon*. **Phytochemistry**, 2020.

### **Participación en eventos**

*I Euroindoamerican Natural Products Meeting (I EIAMNP)*. Cytotoxic activity of gibbilimbol B from *Piper eriopodon* on human cancer cells. Madrid, España, 2018. Modalidad Poster.

*XXV Italo-Latin American Congress of Ethnomedicine*. Cytotoxic alkenylphenols from *Piper eriopodon* (Piperaceae). Modena, Italia, 2016. Modalidad Presentación oral.

*V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat*. Screening preliminar en la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica en especies vegetales pertenecientes al género *Piper* (Piperaceae). Bogotá, Colombia, 2016. Modalidad Poster.

*XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica y VIII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO*. Screening preliminar en la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica en especies vegetales pertenecientes al género *Piper* (Piperaceae). Bogotá, Colombia, 2016. Modalidad Poster.



## **A. Anexo A: Información suplementaria de los capítulos 3 y 4**

### **Capítulo 3**

La identificación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo por medio del análisis de los diferentes espectros de IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones, así como el análisis de algunos experimentos TOCSY-selectivos y J-Resolved. La masa molecular de alta resolución para cada compuesto fue determinada por medio de espectros de HRESIMS en modo negativo. A continuación, se presentan cada uno de los espectros sobre los cuales se realizó el análisis estructural de los compuestos 1 a 9 en las figuras IS.3-1 a IS.3-43.

Figuras IS.3-1 a IS.3-4	Compuesto 1
Figuras IS.3-5 a IS.3-8	Compuesto 2
Figuras IS.3-9- a IS.3-12	Compuesto 3
Figuras IS.3-13 a IS.3-17	Compuesto 4
Figuras IS.3-18 a IS.3-21	Compuesto 5
Figuras IS.3-22 a IS.3-25	Compuesto 6
Figuras IS.3-26 a IS.3-31	Compuesto 7
Figuras IS.3-32 a IS.3-37	Compuesto 8
Figuras IS.3-38 a IS.3-43	Compuesto 9

### **Capítulo 4**

Se anexan las figuras IS.4-44 y IS.4-45:

- Figura IS.4-44 Análisis por western blot de (A) caspasa 7 clivada en células MCF7 y MCF10A tratadas con eripodol A, gibbilimbol B y erioquinol. (B) XIAP y caspasa 7 clivada en células MCF7 transfectadas con un siRNA control o específico para XIAP durante 24 h a concentración de 100 nM
- Figura IS.4-45 Proporción de las interacciones del ligando con la proteína, durante la dinámica molecular de 50 ns entre la proteína XIAP y los compuestos embelina, erioquinol, eripodol A y gibbilimbol B.

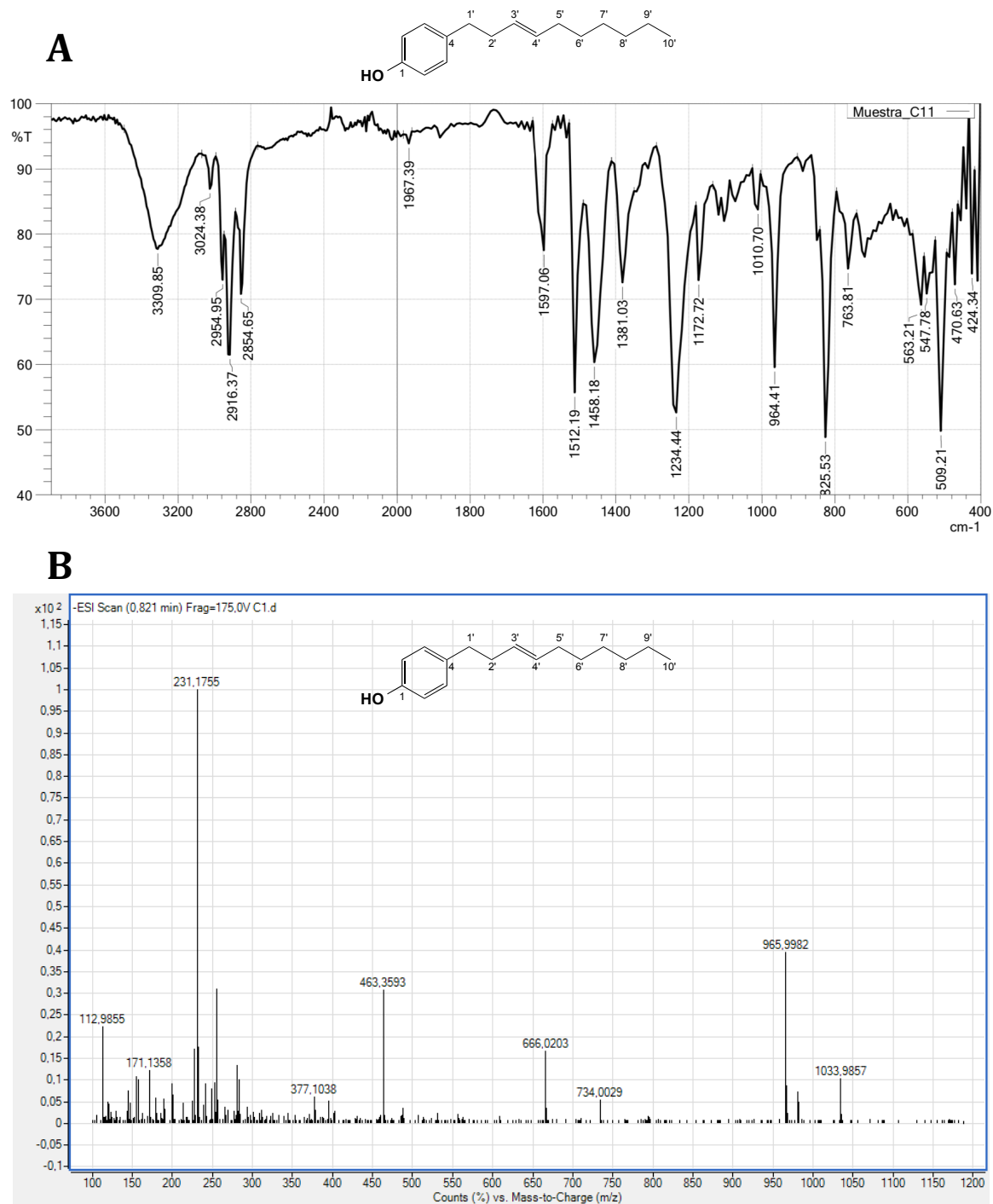
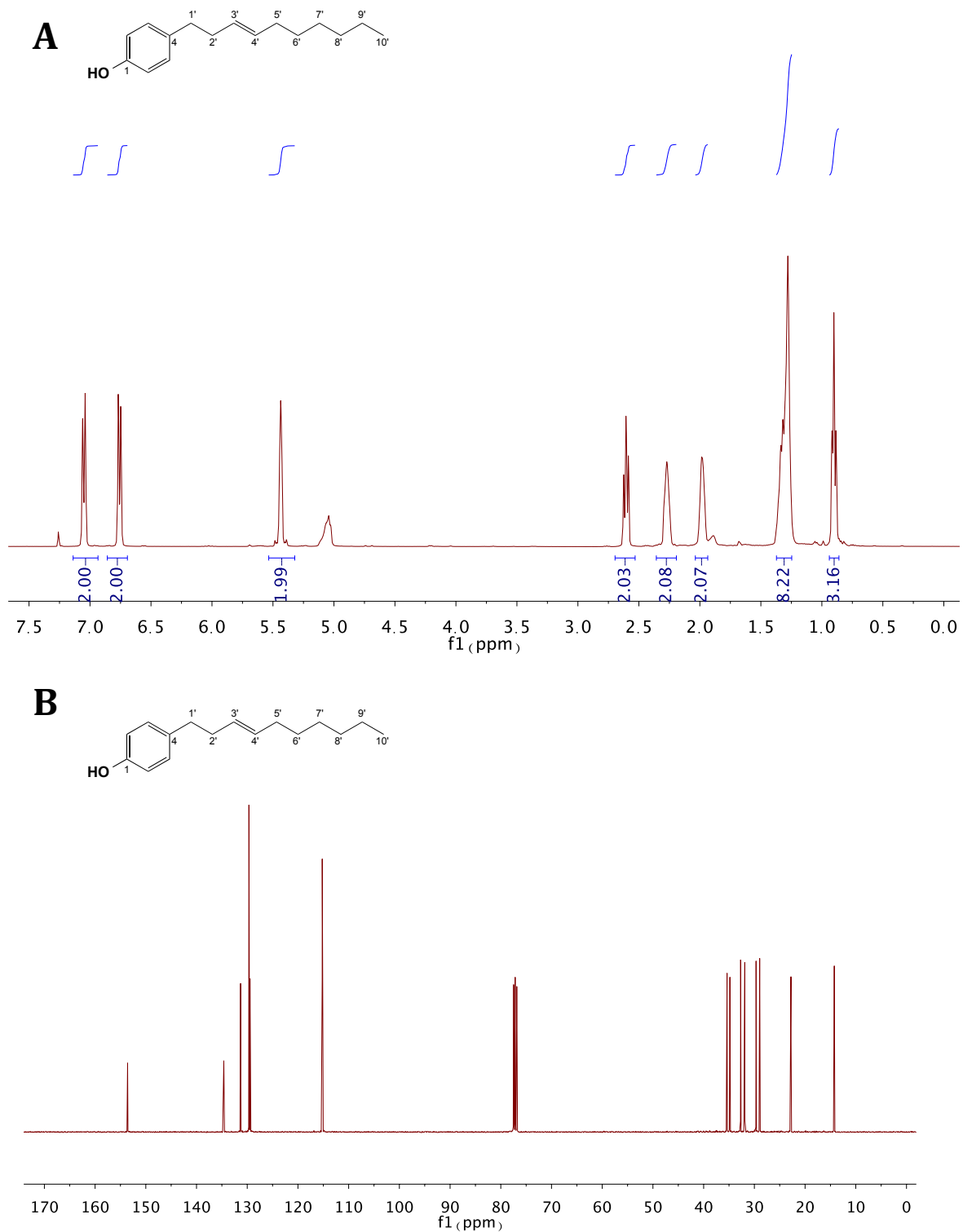


Figura IS.3-1: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 1.



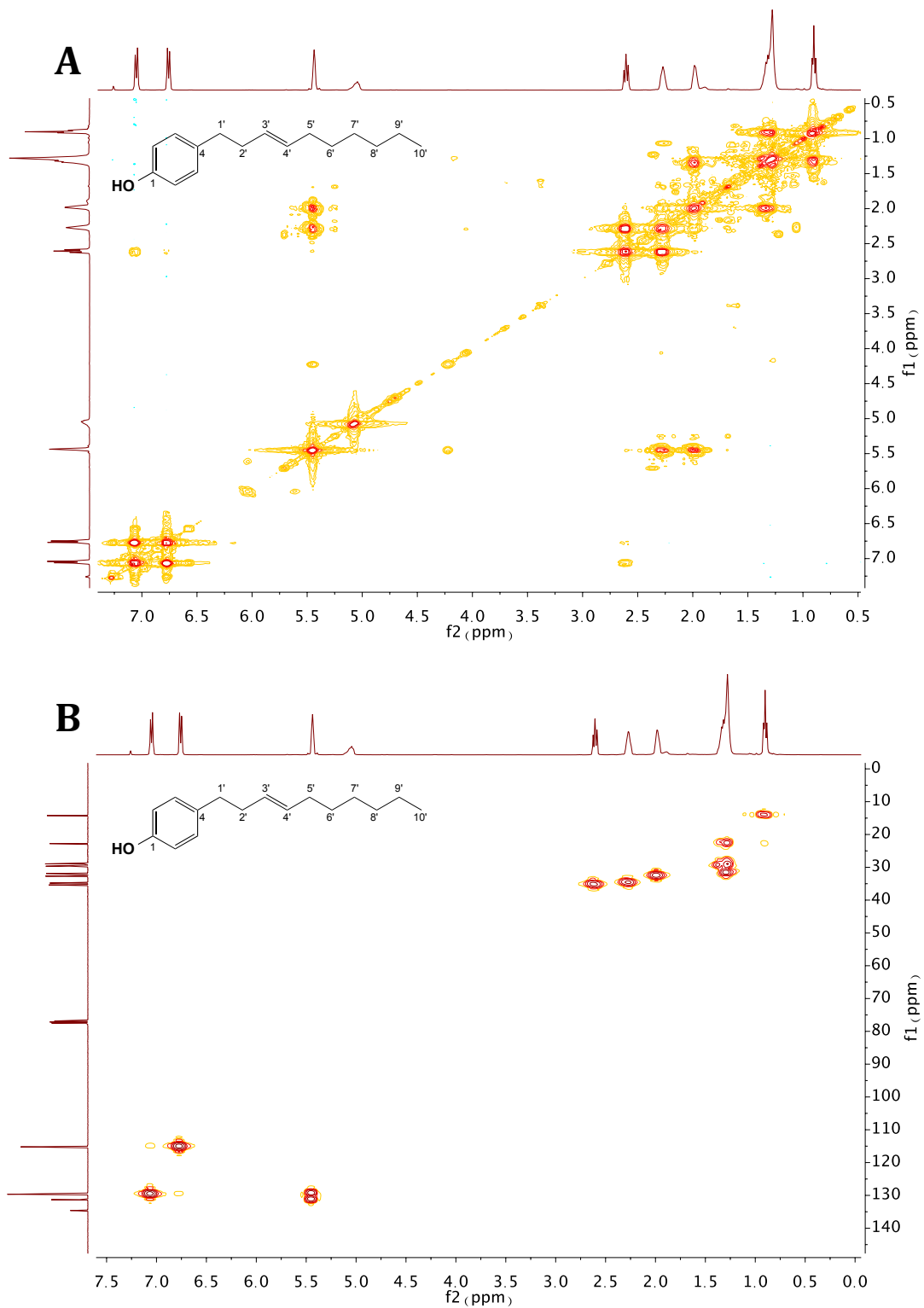
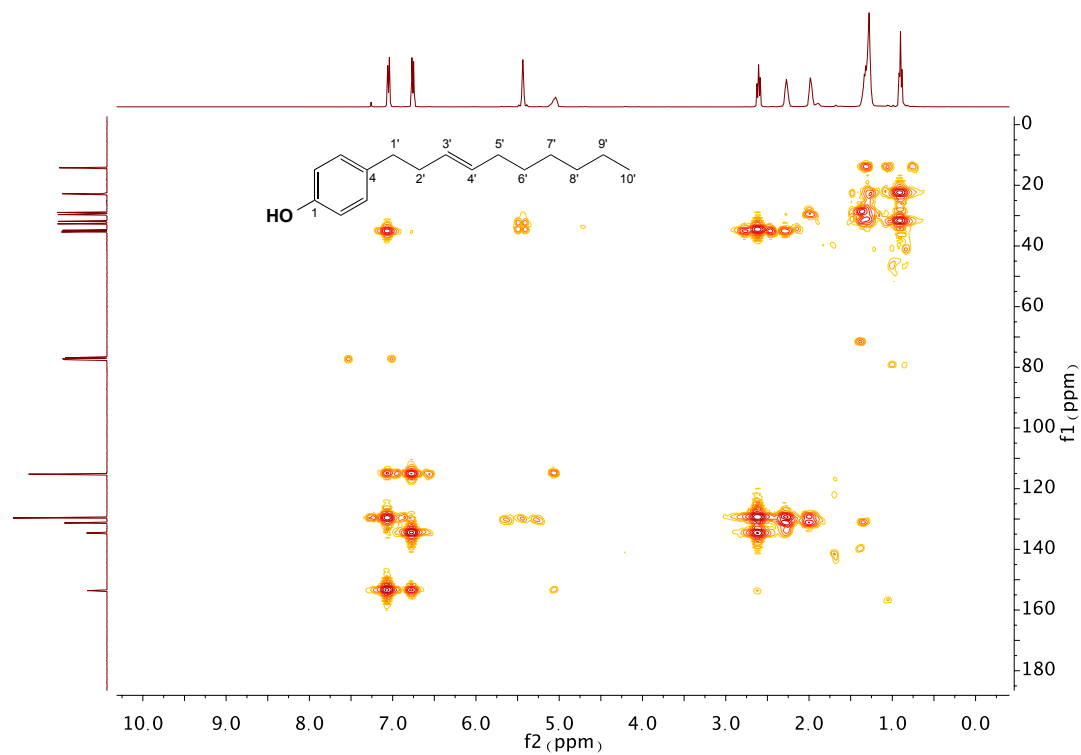


Figura IS.3-3: Experimentos COSY (A) y HMQC (B) para el compuesto 1.



**Figura IS.3-4:** Experimento HMBC para el compuesto 1.

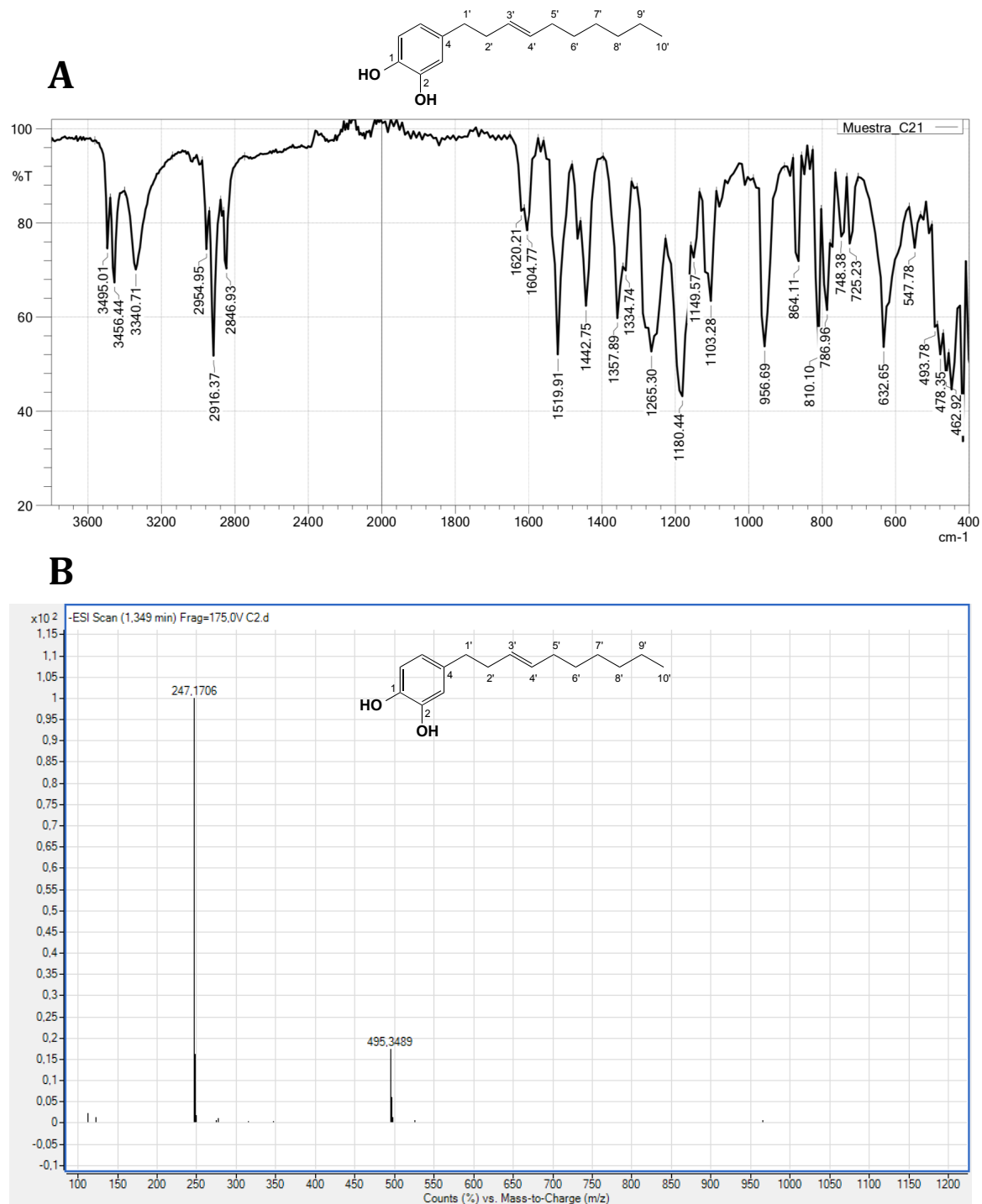
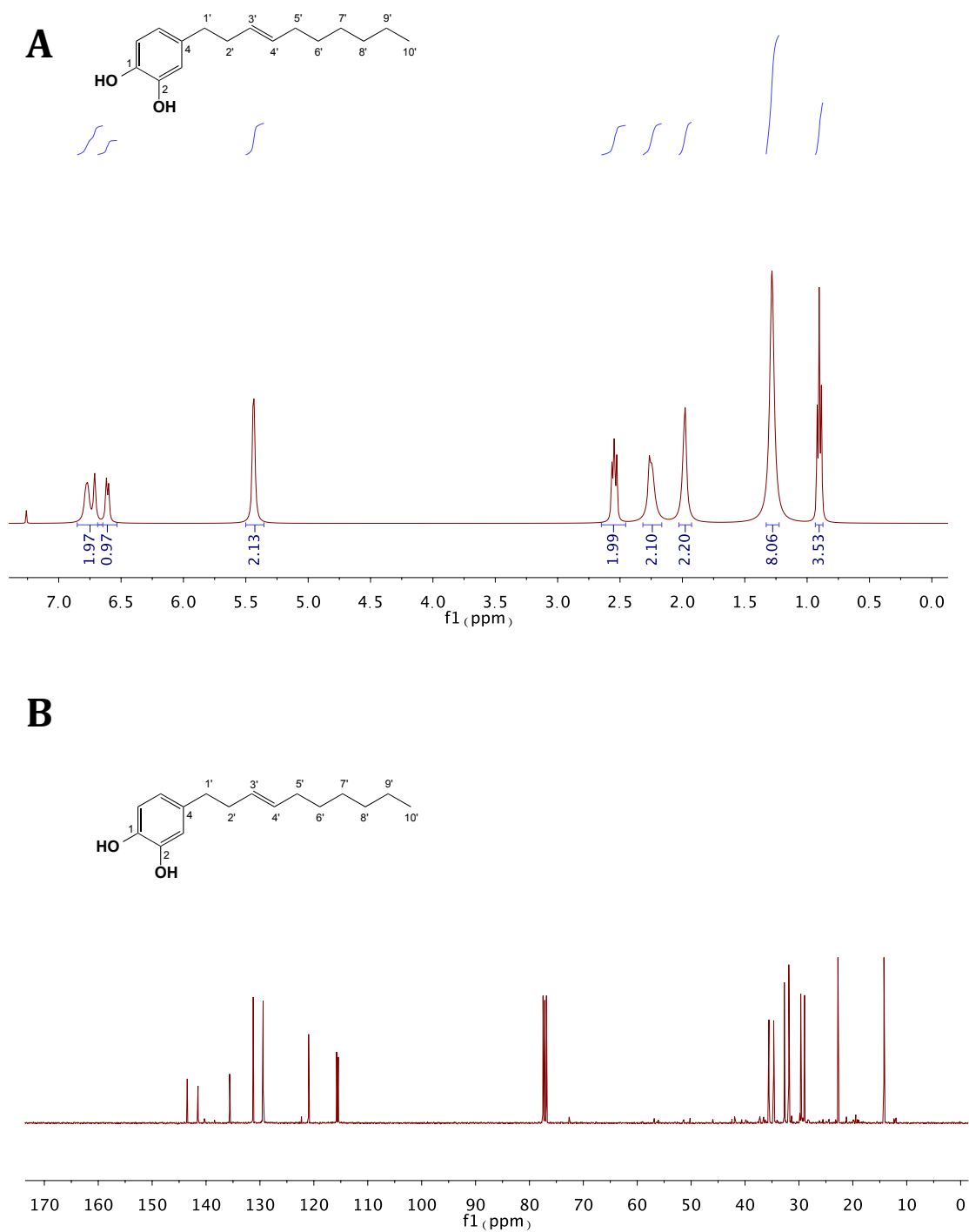


Figura IS.3-5: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 2.



**Figura IS.3-6:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(A)** y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(B)** para el compuesto 2.

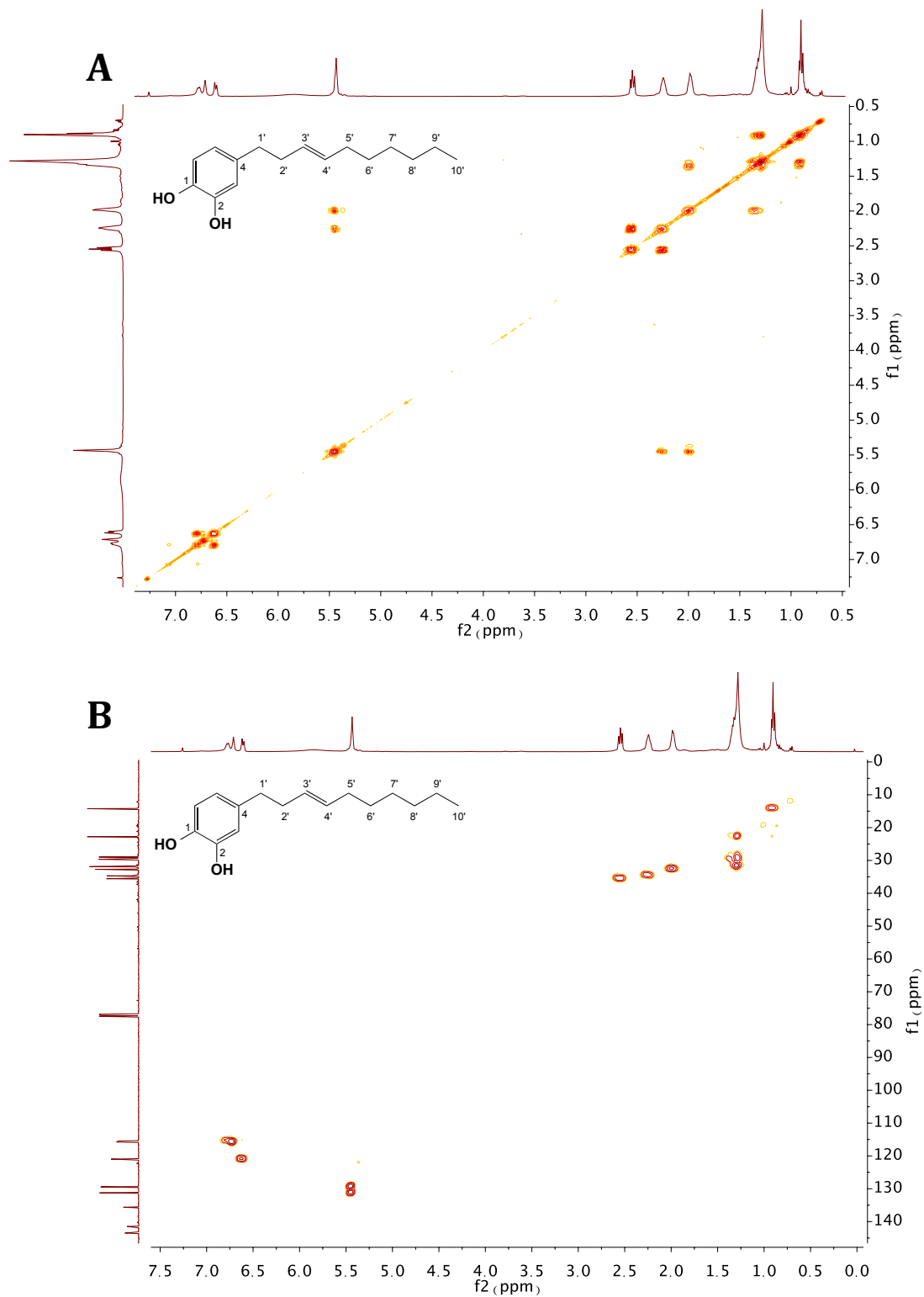


Figura IS.3-7: Experimentos COSY (A) y HMQC (B) para el compuesto 2.



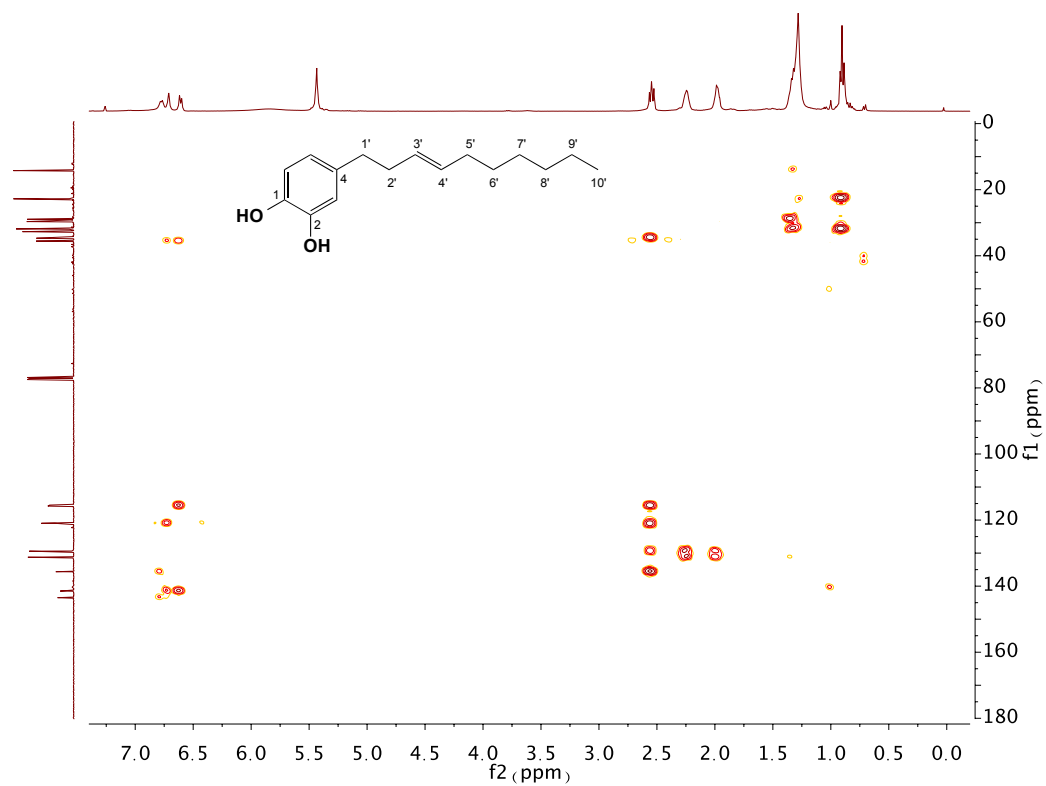


Figura IS.3-8: Experimento HMBC para el compuesto 2.

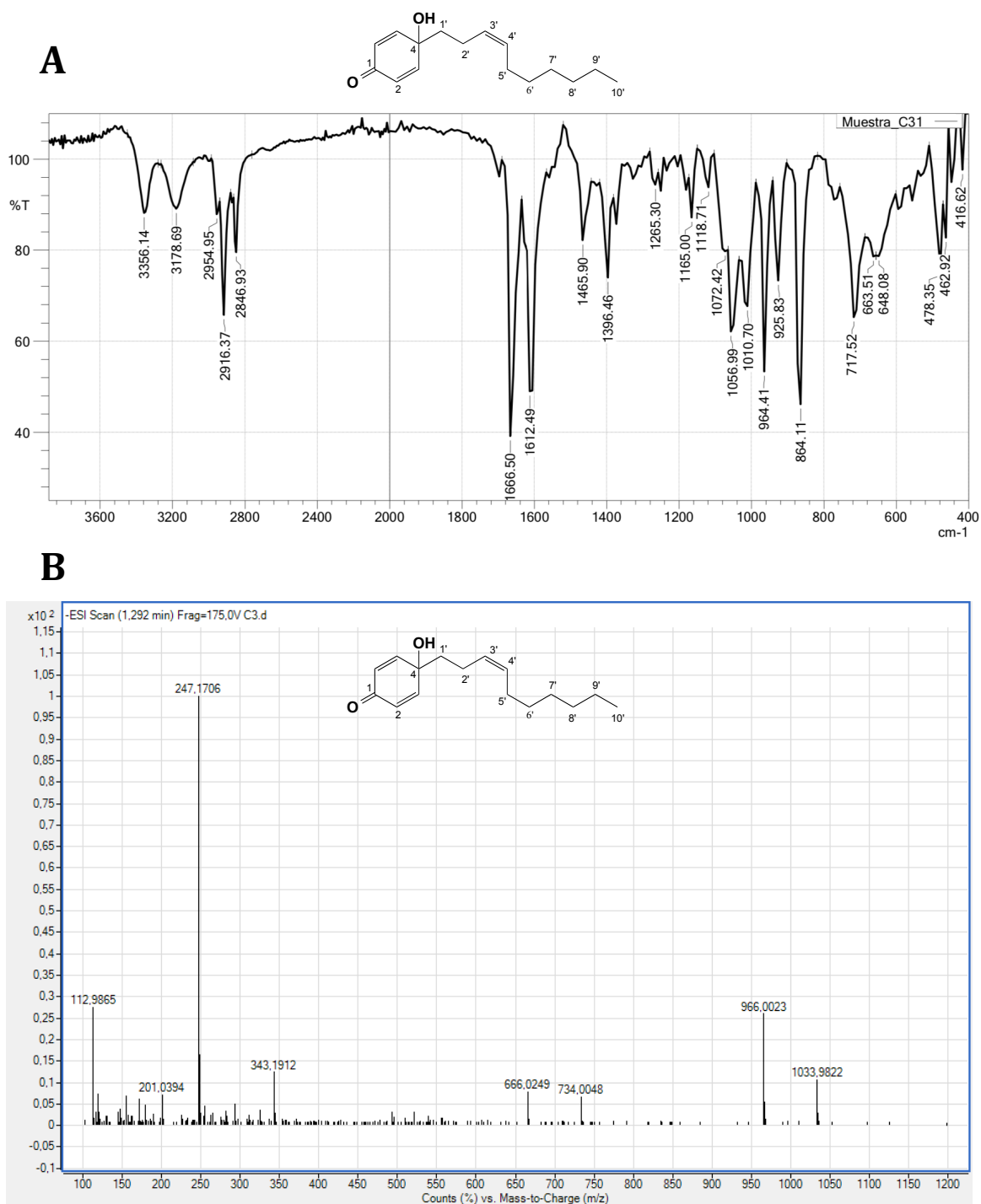
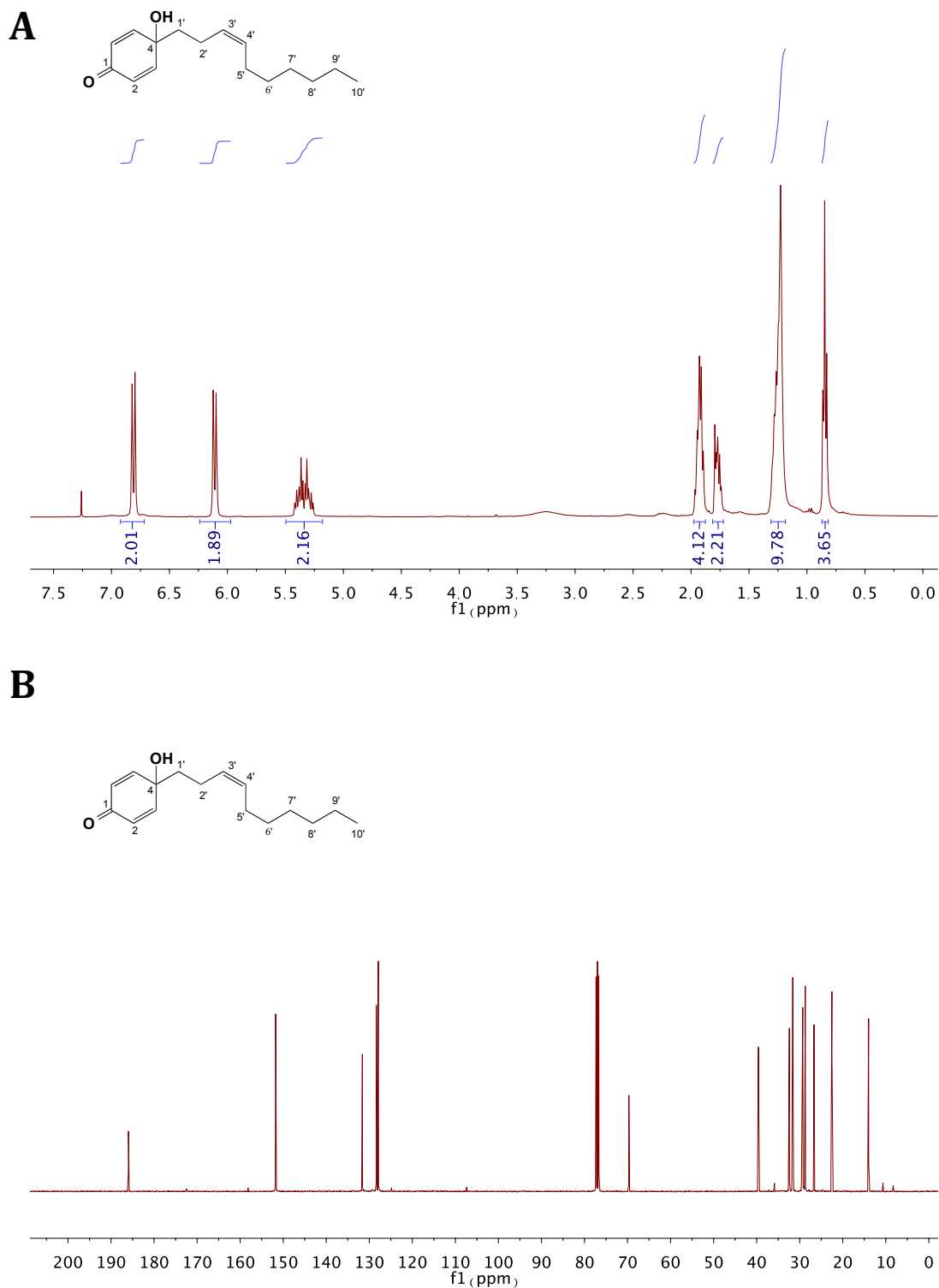
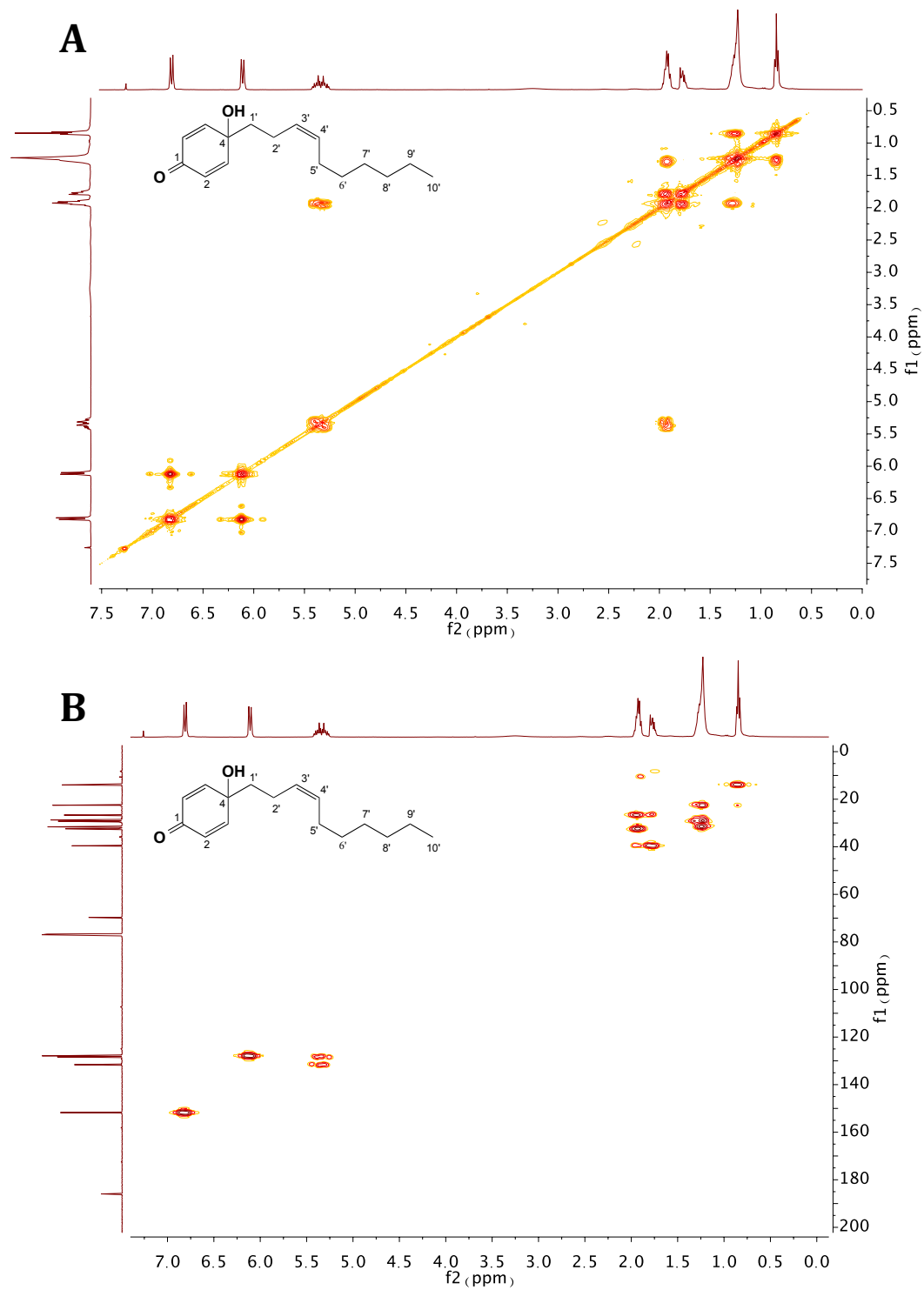
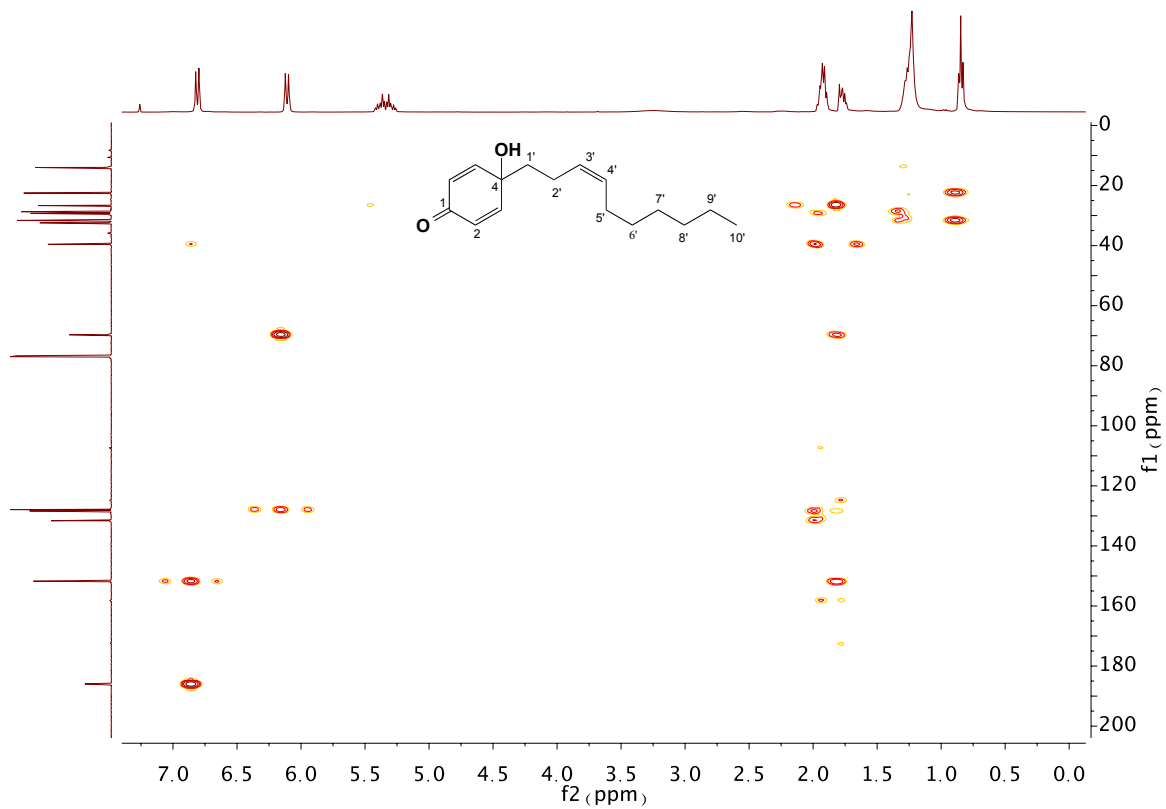


Figura IS.3-9: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 3.





**Figura IS.3-11:** Experimentos COSY (A) y HMQC (B) para el compuesto 3.



**Figura IS.3-12:** Experimento HMBC para el compuesto 3.

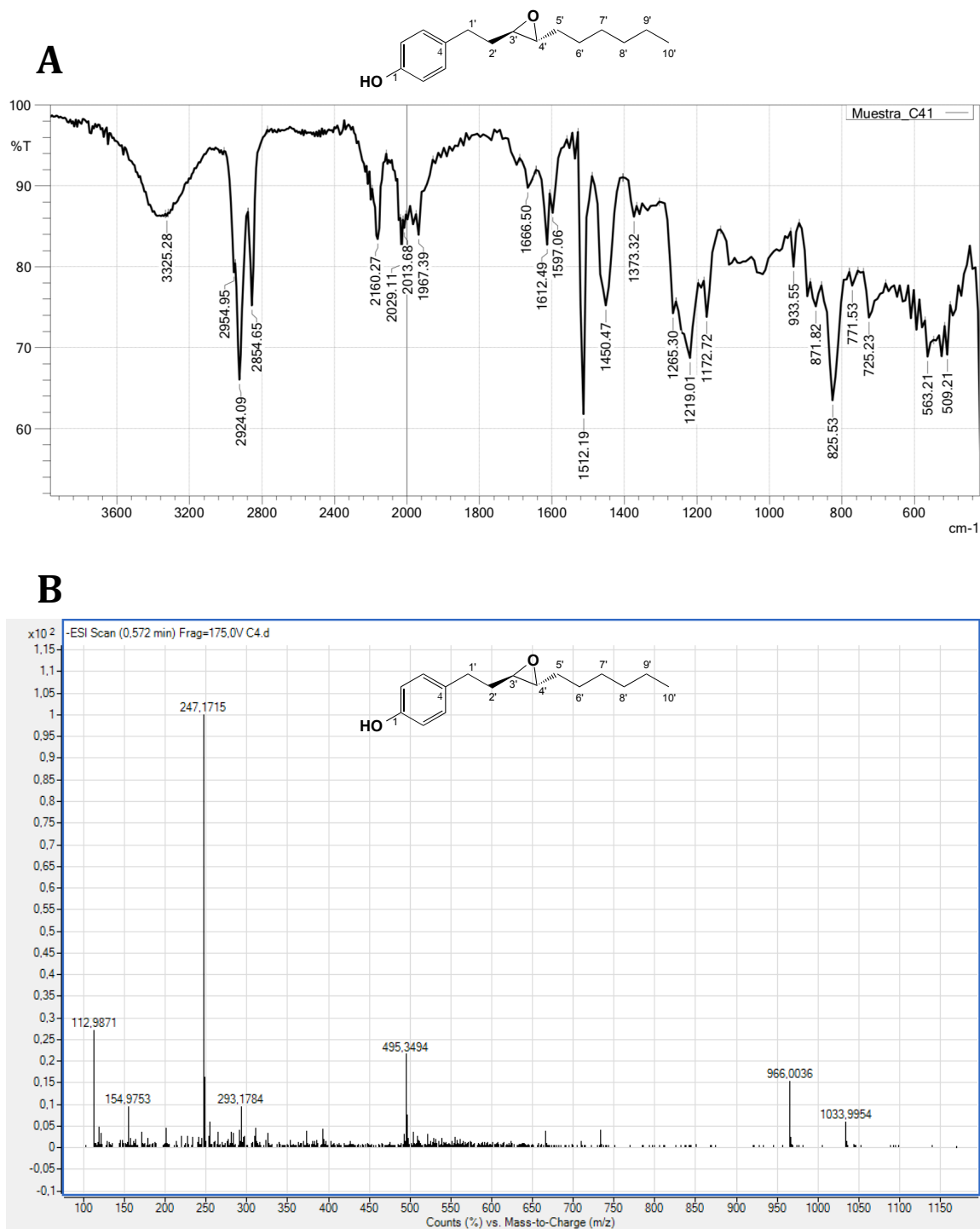
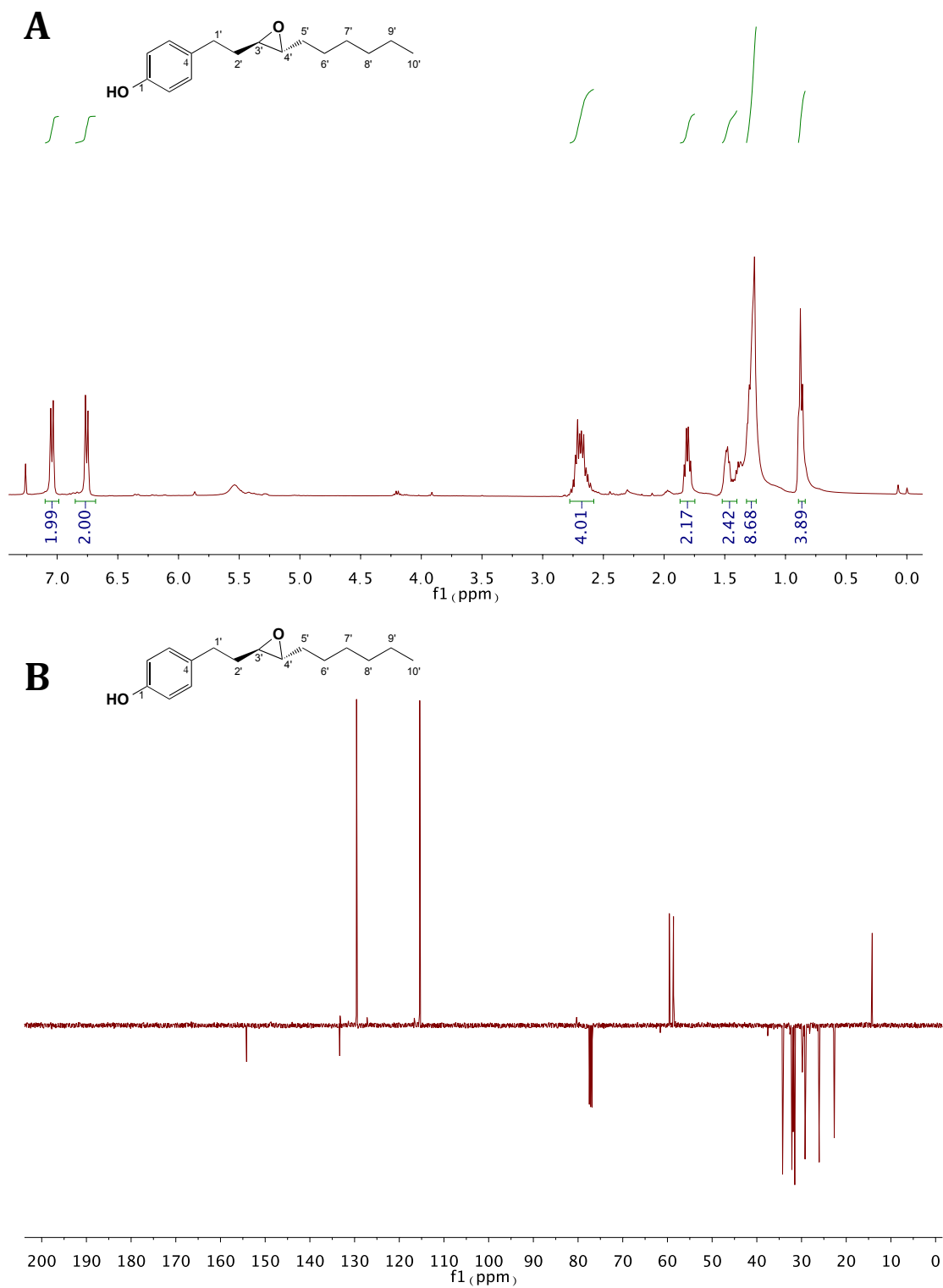


Figura IS.3-13: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 4.



**Figura IS.3-14:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(A)** y APT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(B)** para el compuesto 4.

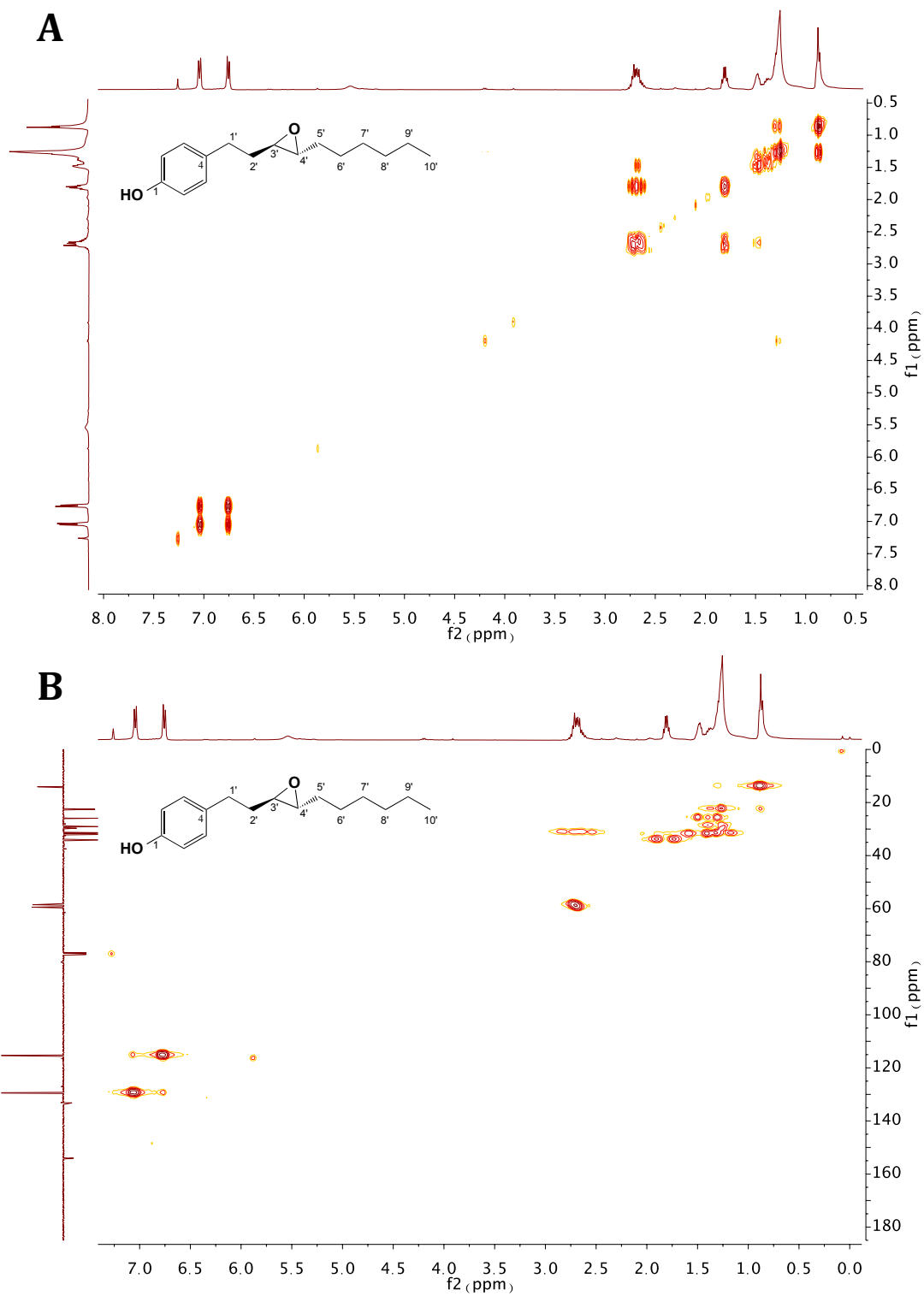


Figura IS.3-15: Experimentos COSY (A) y HMQC (B) para el compuesto 4.



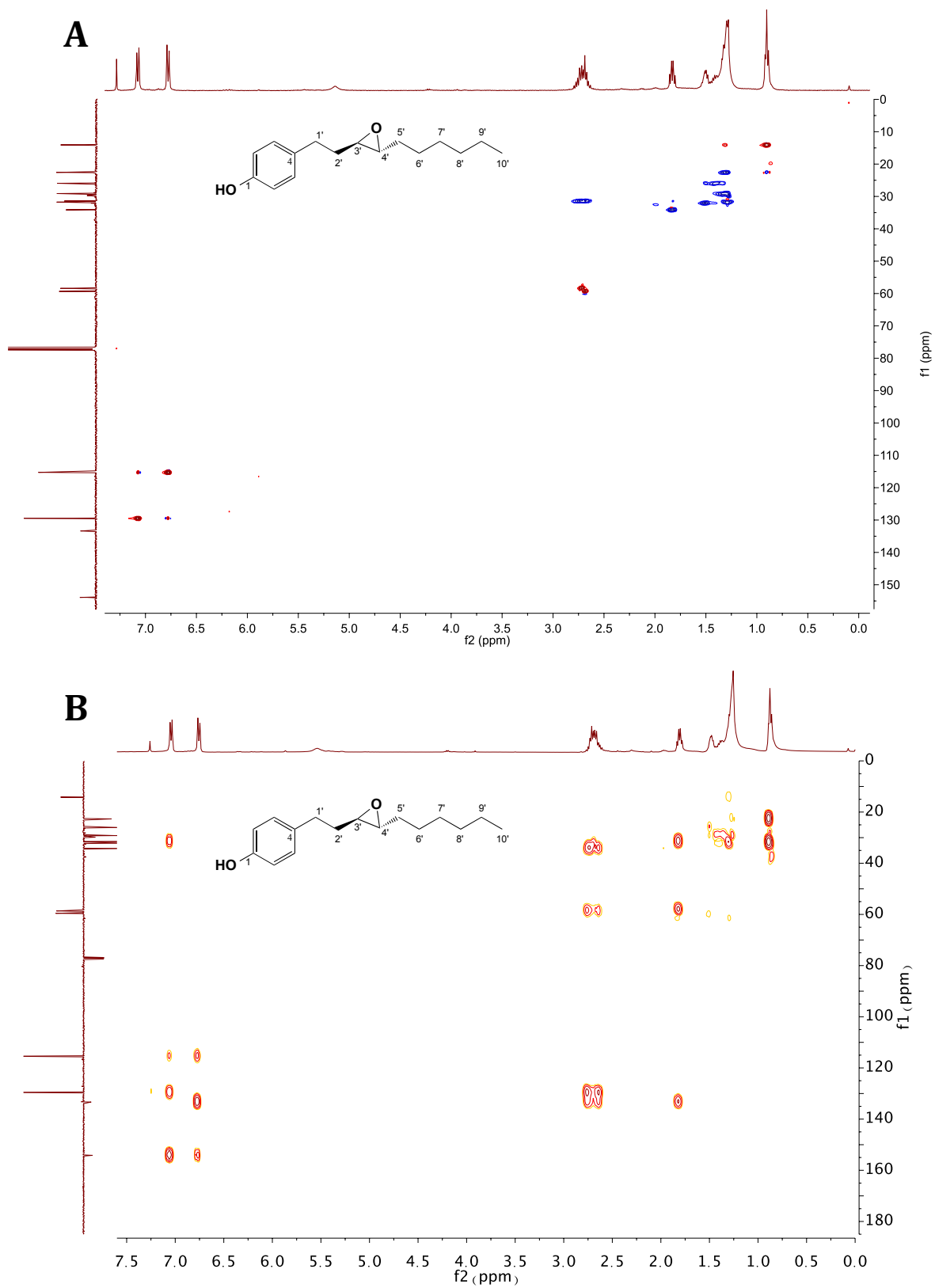


Figura IS.3-16: Experimentos HSQC (A) y HMBC (B) para el compuesto 4.

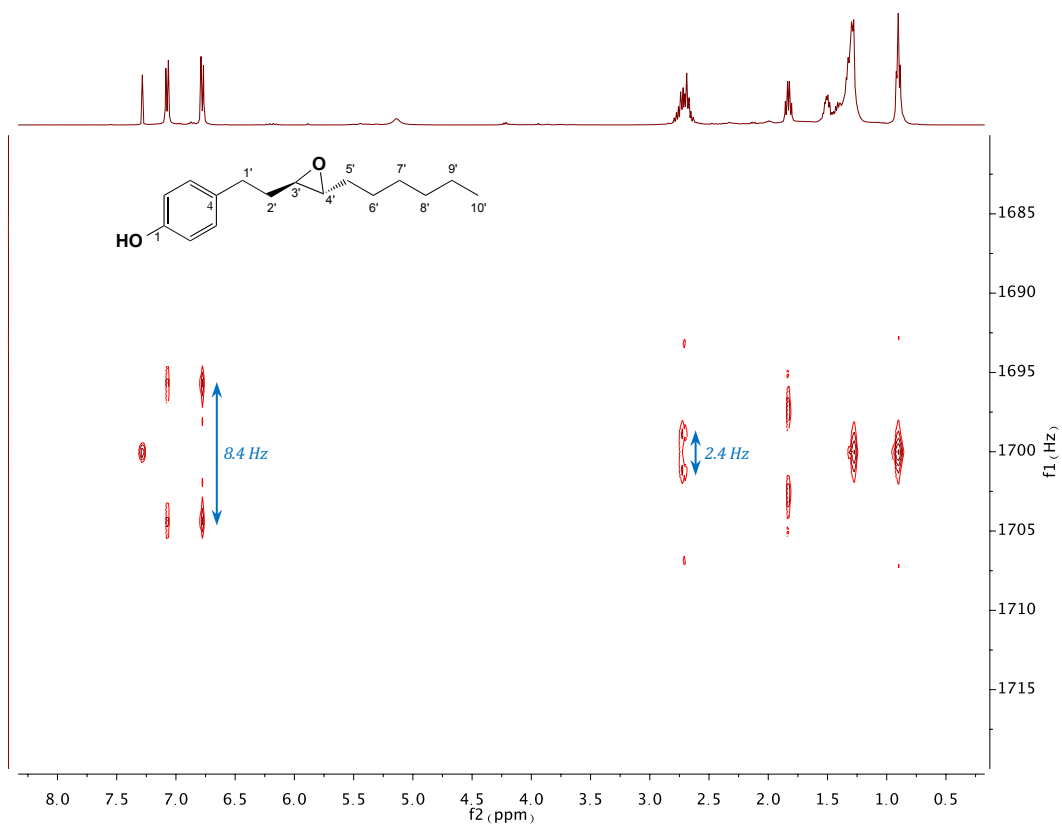
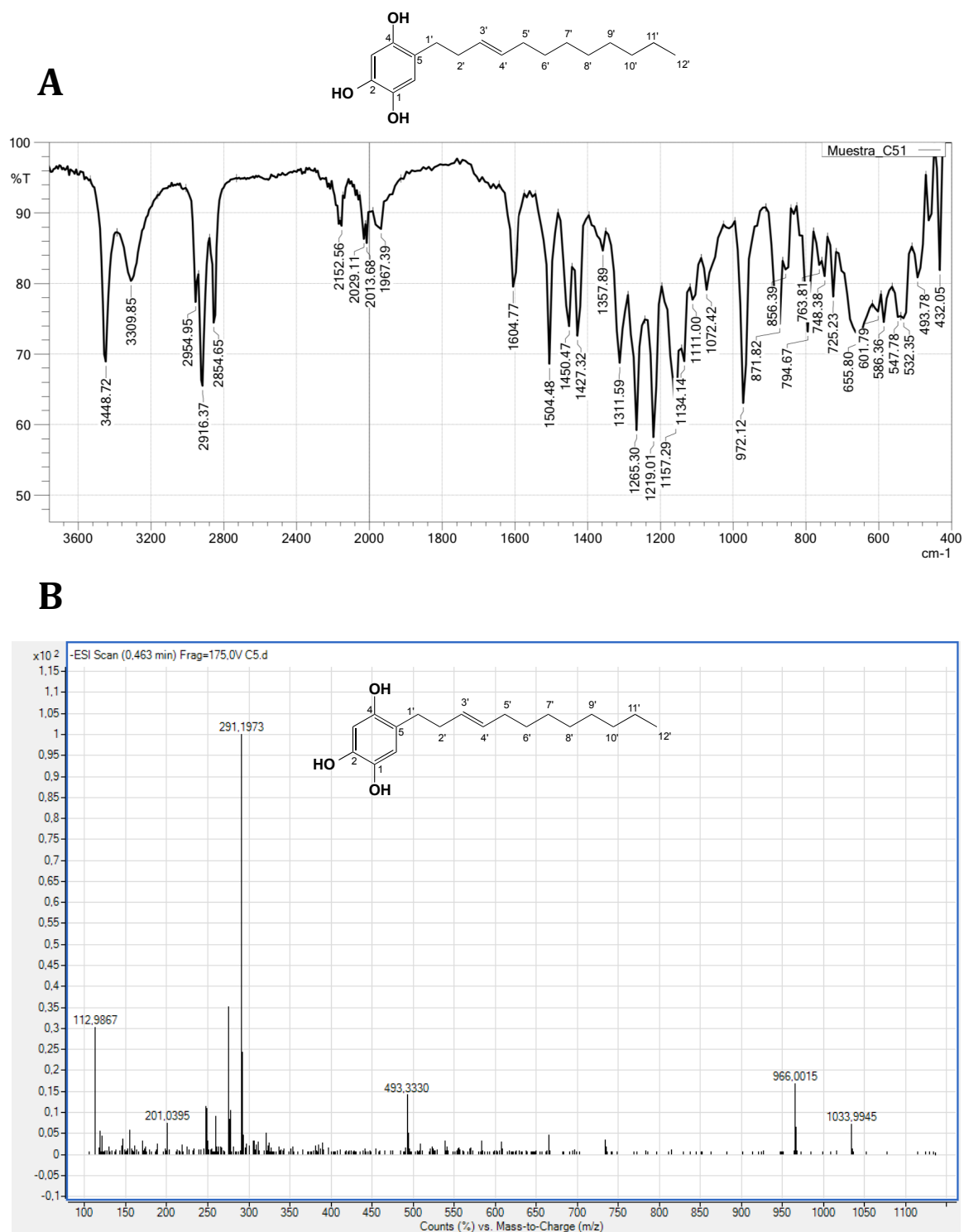
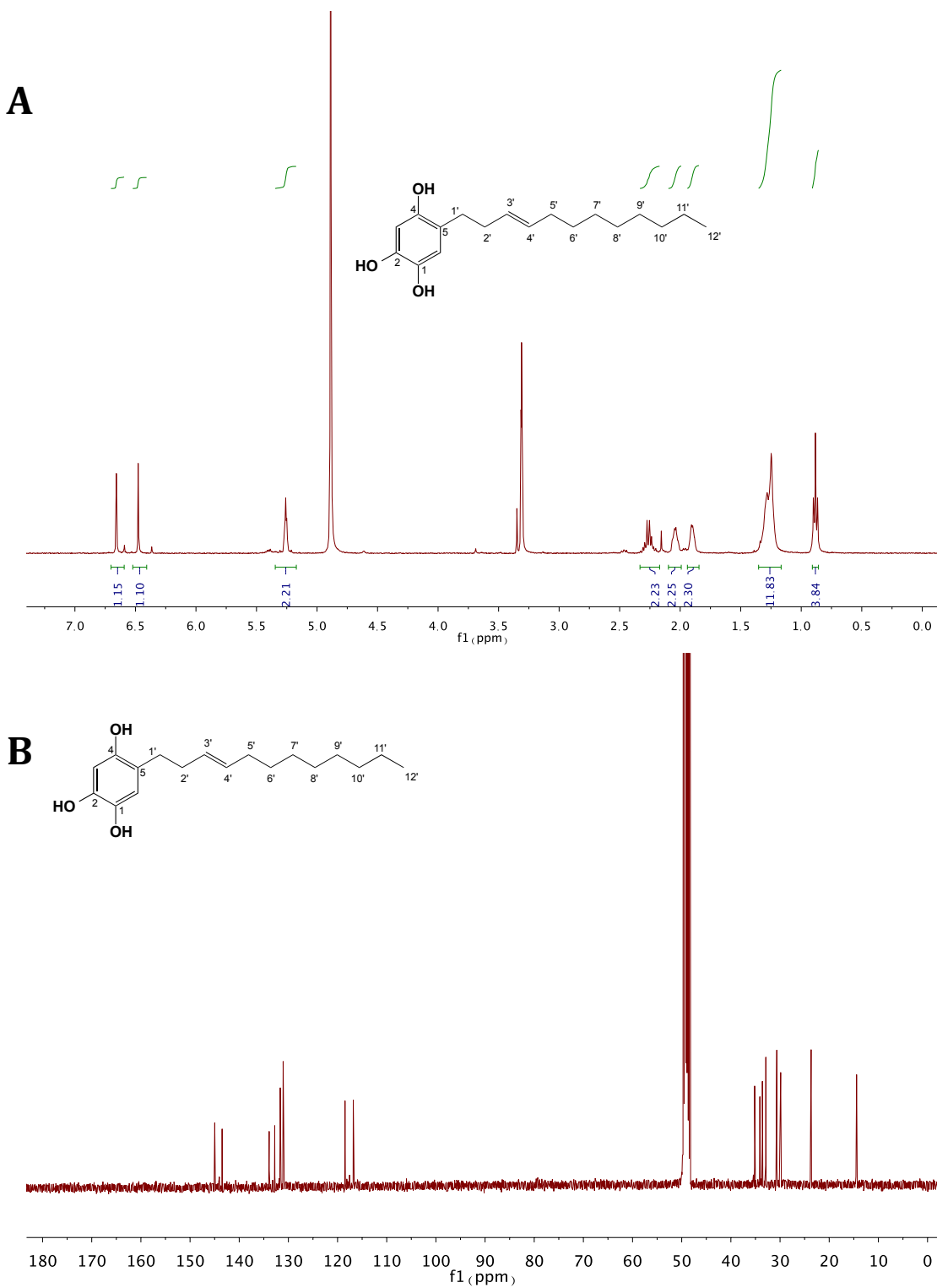


Figura IS.3-17: Experimento J-Resolved para el compuesto 4.



**Figura IS.3-18:** Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 5.



**Figura IS.3-19:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) **(A)** y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) **(B)** para el compuesto 5.

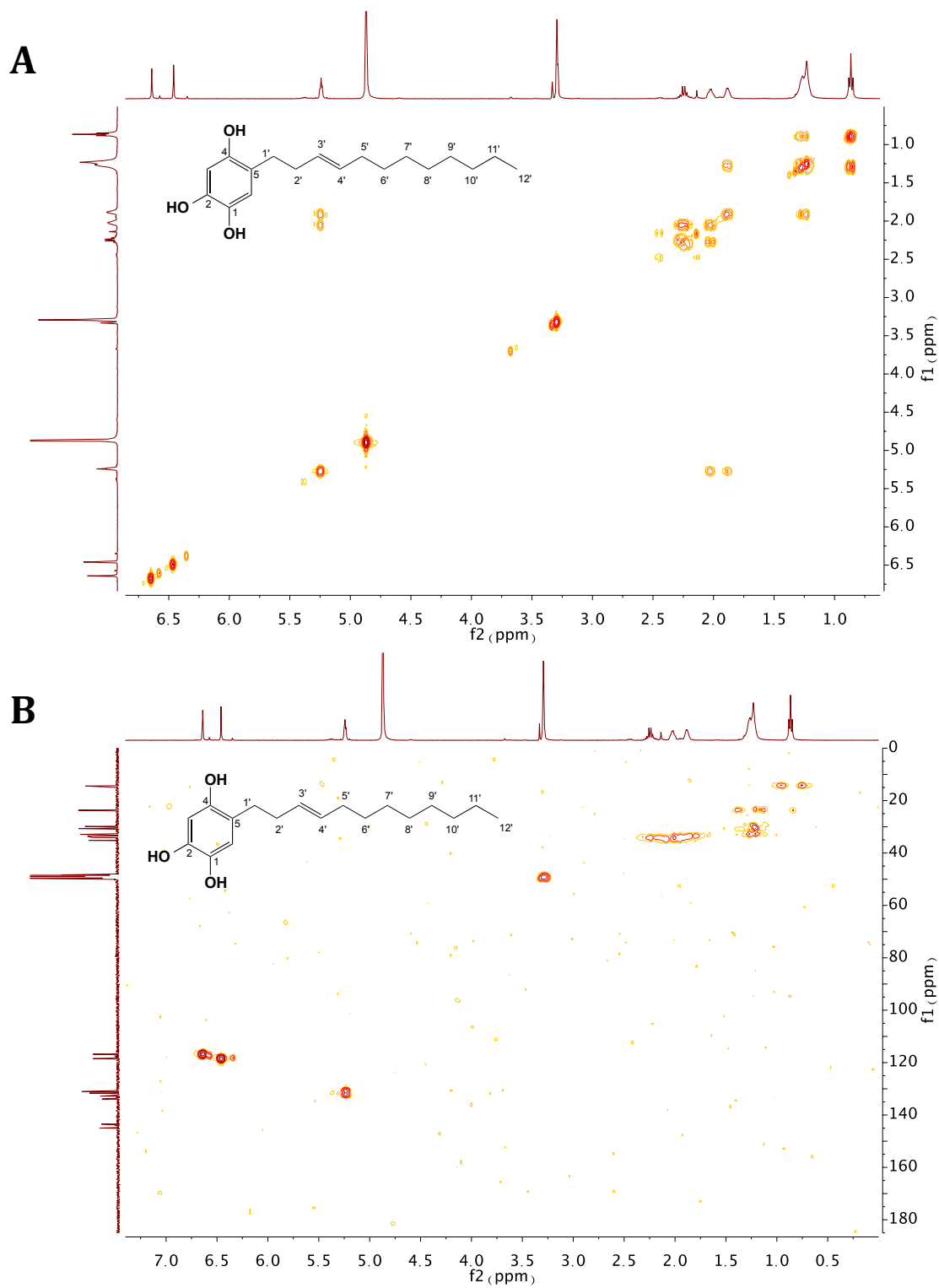
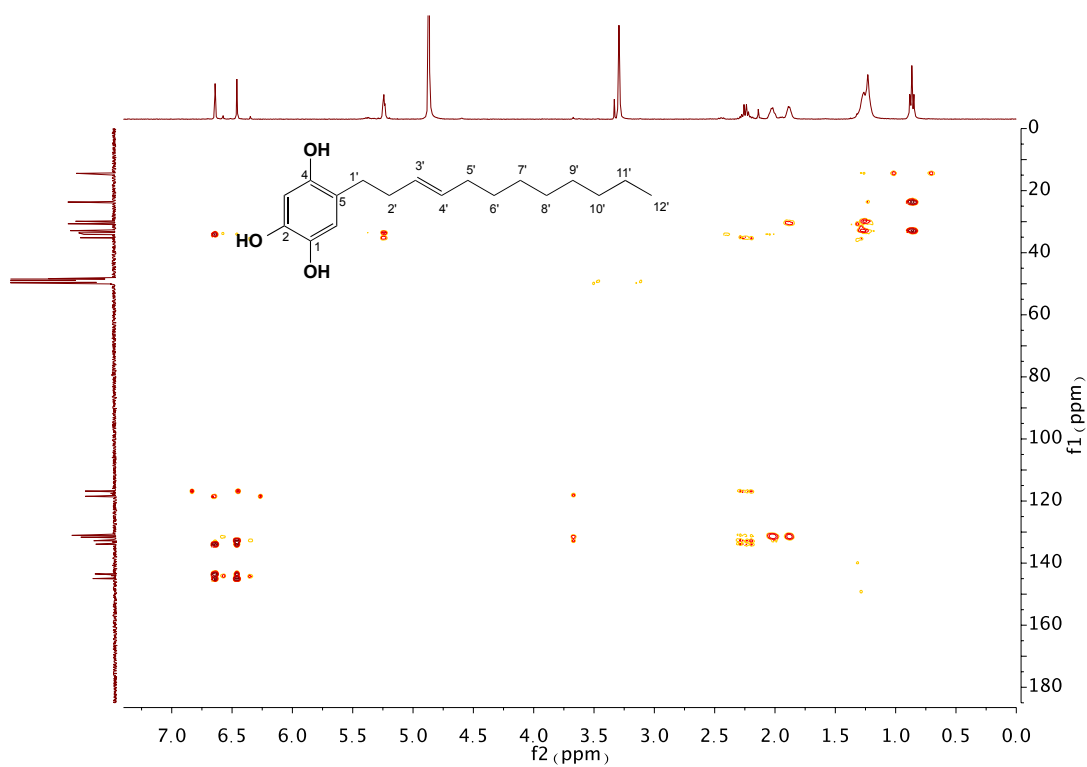


Figura IS.3-20: Experimentos COSY (A) y HMQC (B) para el compuesto 5.



**Figura IS.3-21:** Experimento HMBC para el compuesto 5.

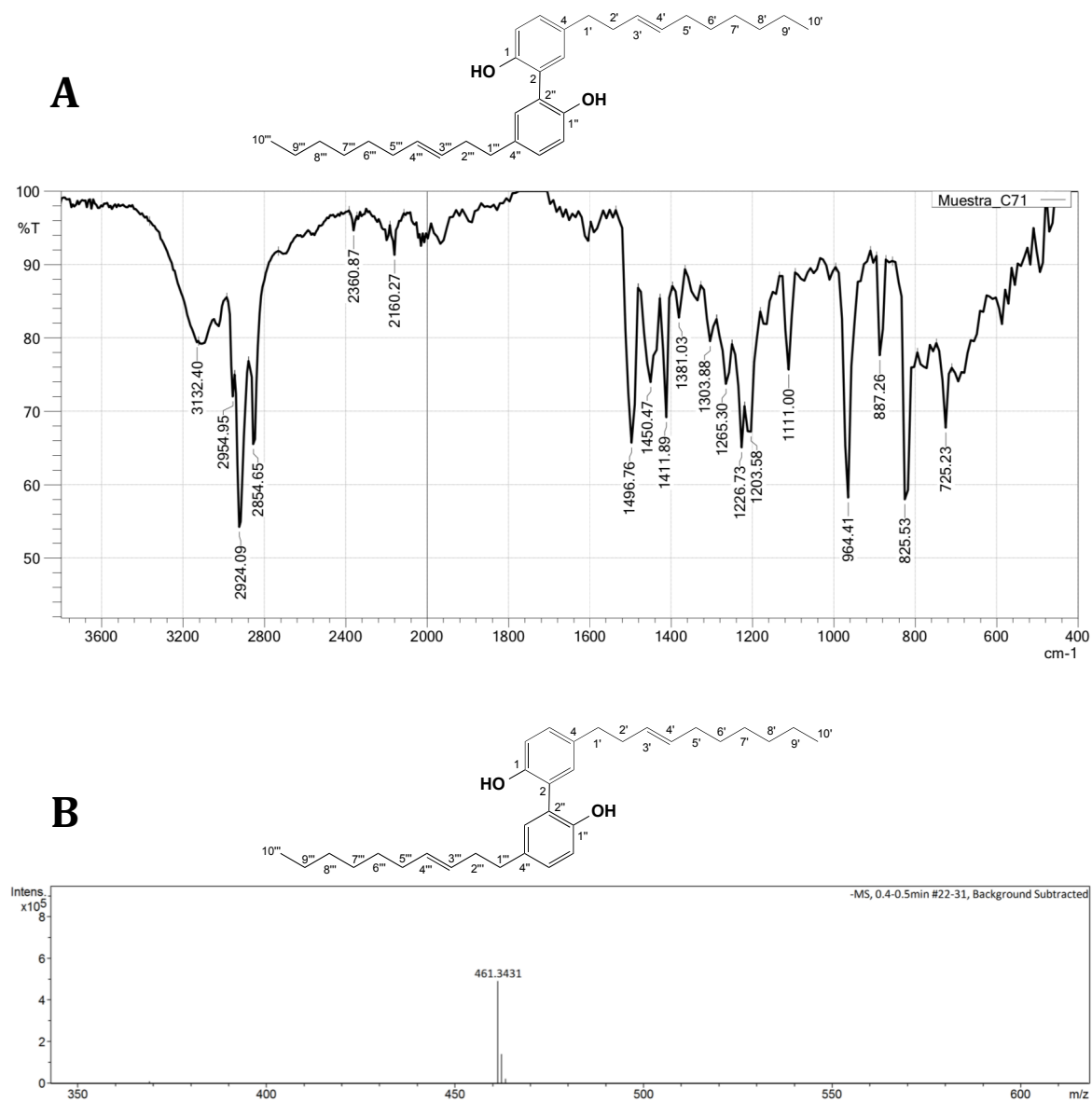
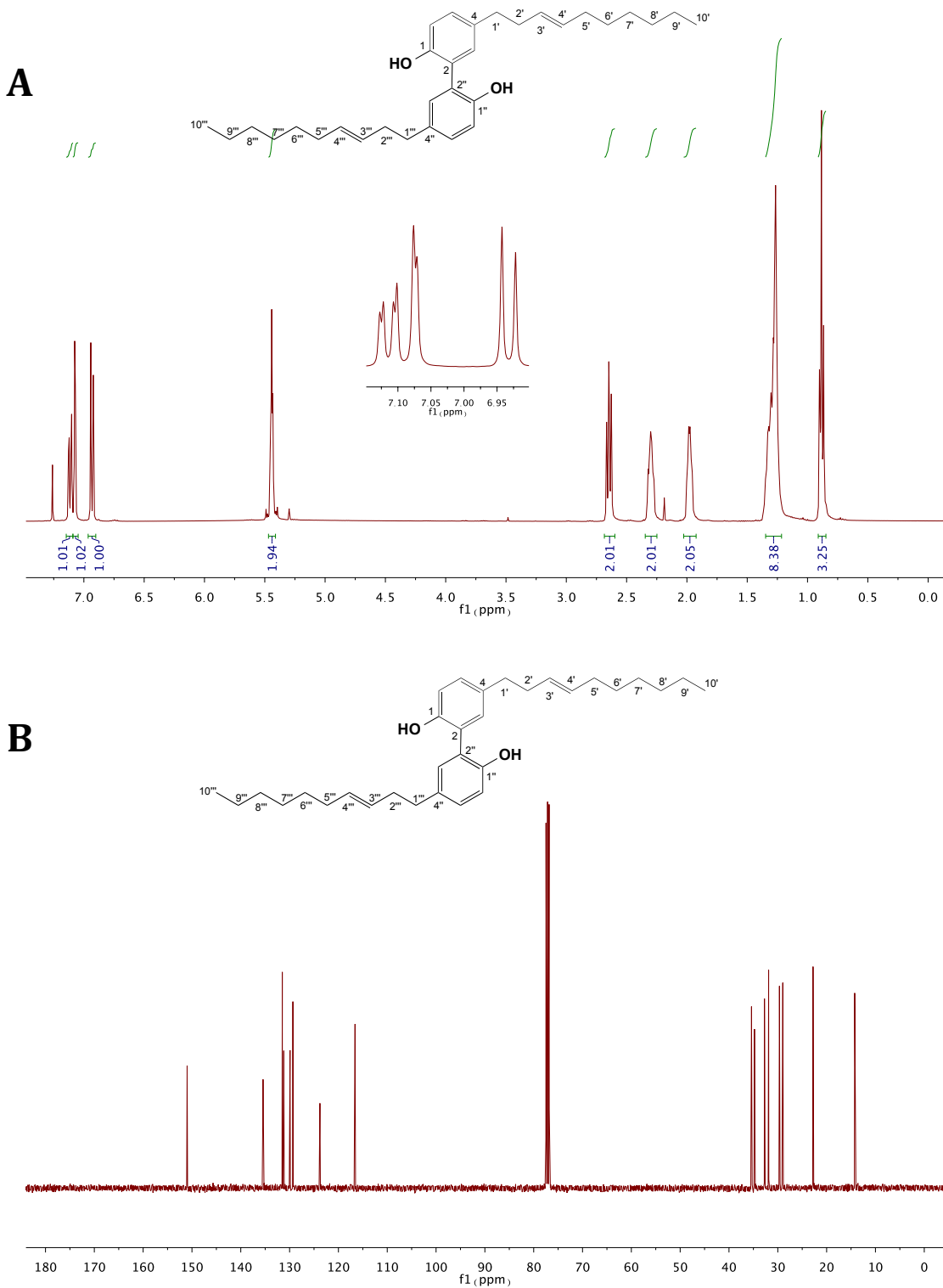


Figura IS.3-22: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 6.



**Figura IS.3-23:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(A)** y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(B)** para el compuesto 6.



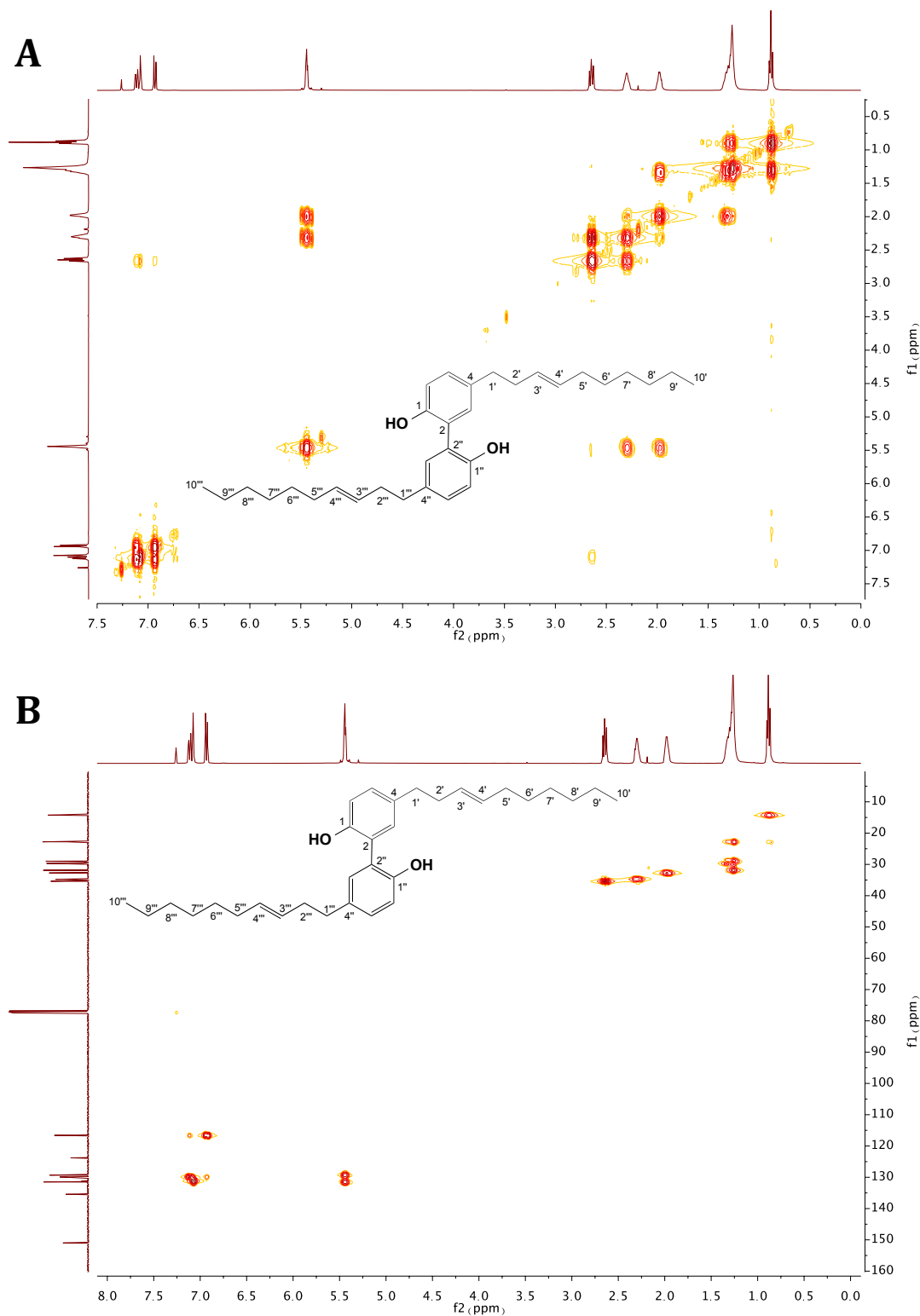


Figura IS.3-24: Experimentos COSY (A) y HMBC (B) para el compuesto 6.

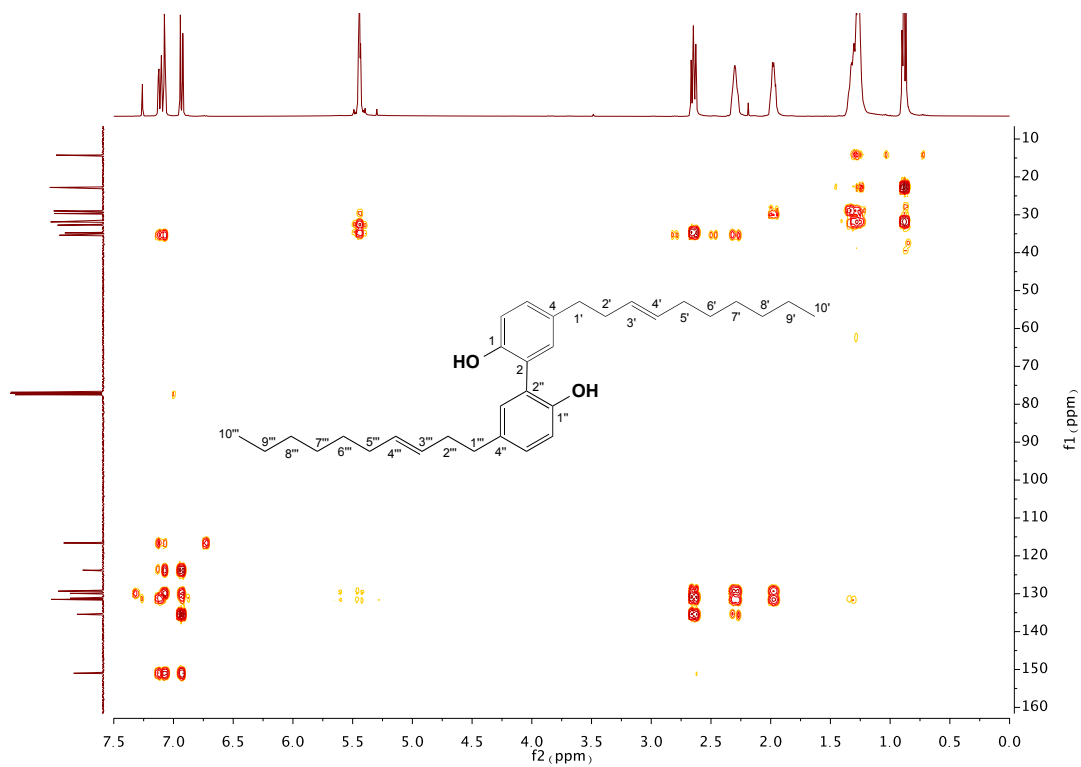


Figura IS.3-25: Experimento HMBC para el compuesto 6.

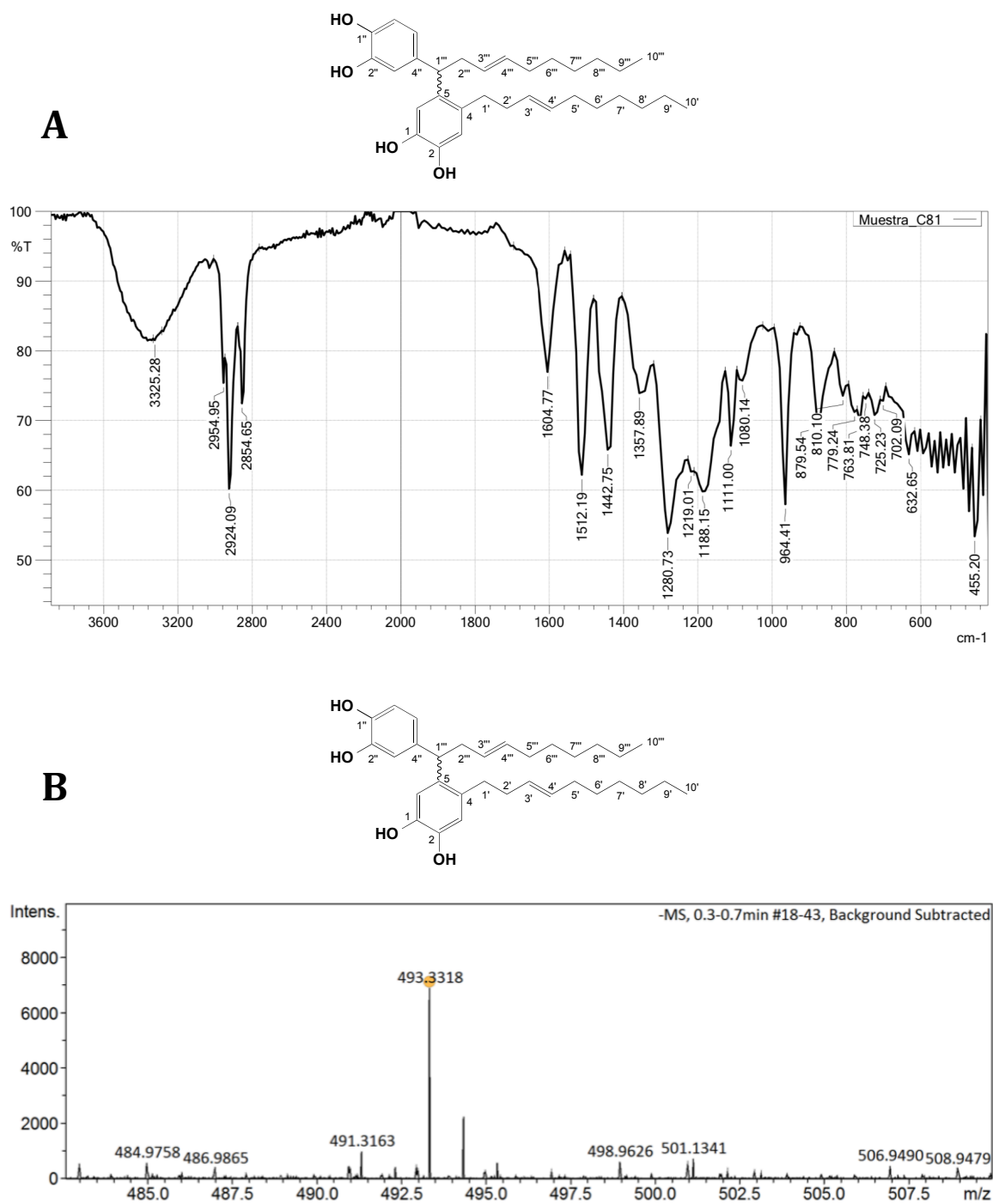
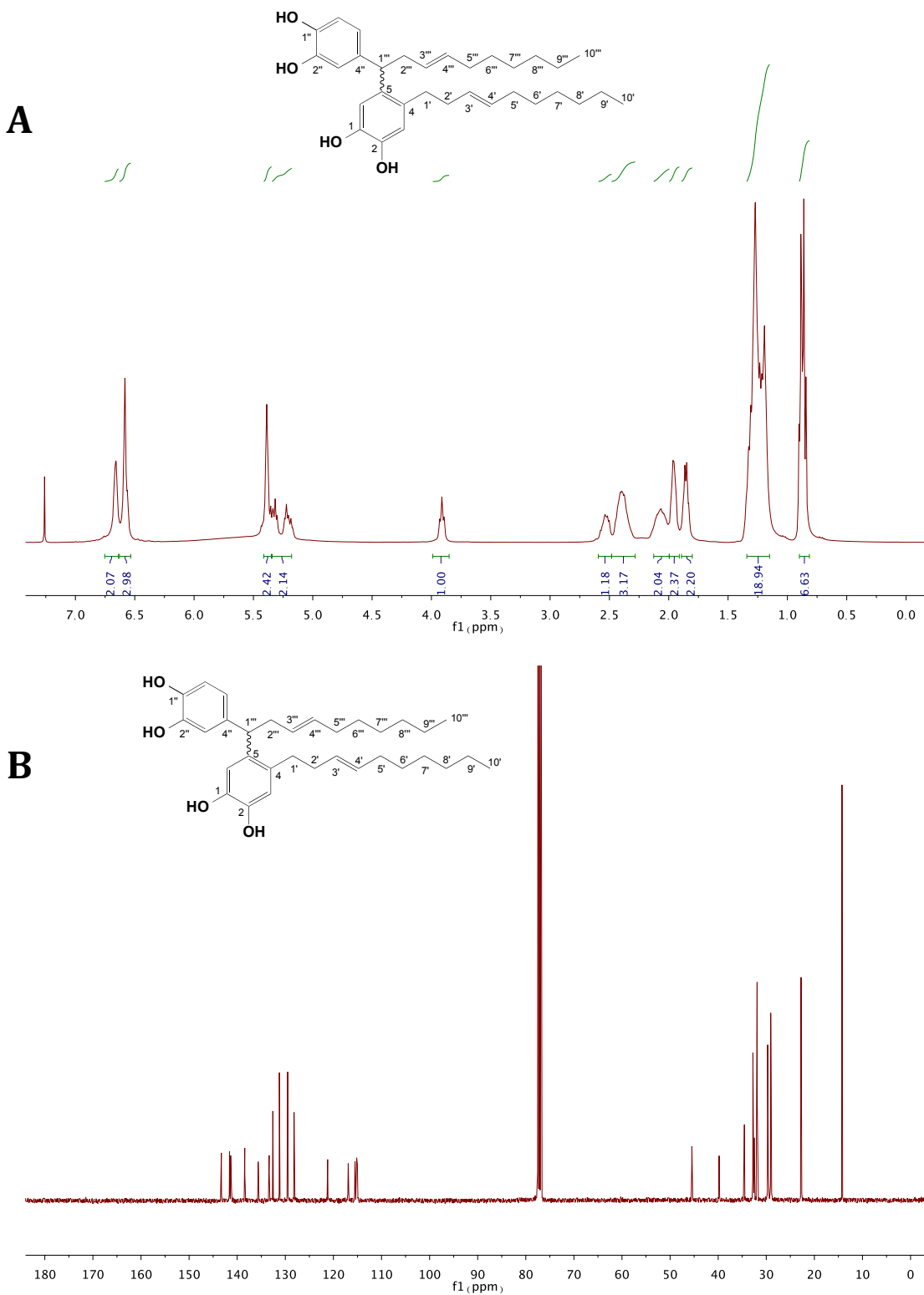


Figura IS.3-26: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 7.



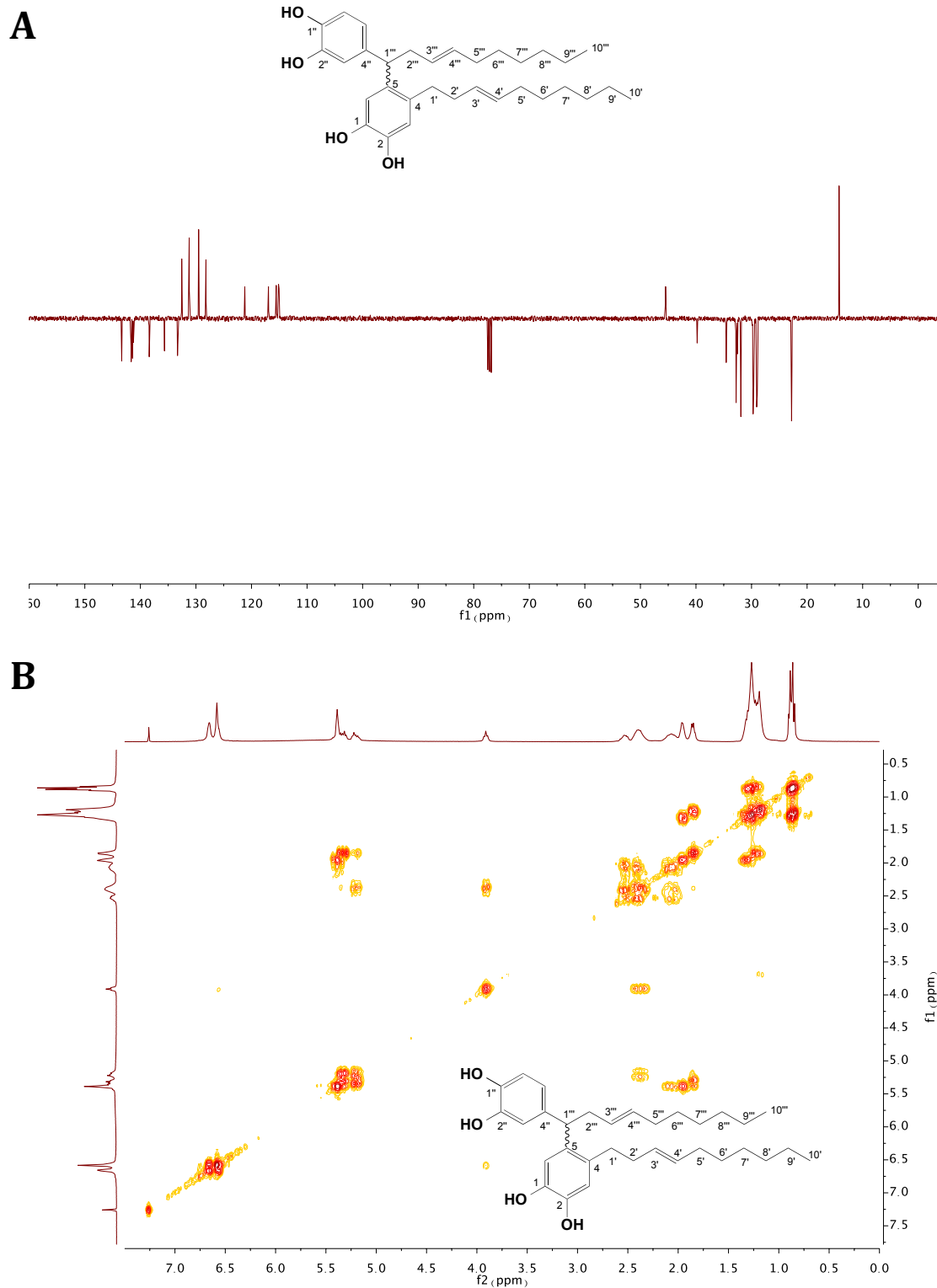


Figura IS.3-28: Experimento APT (A) y COSY (B) para el compuesto 7.

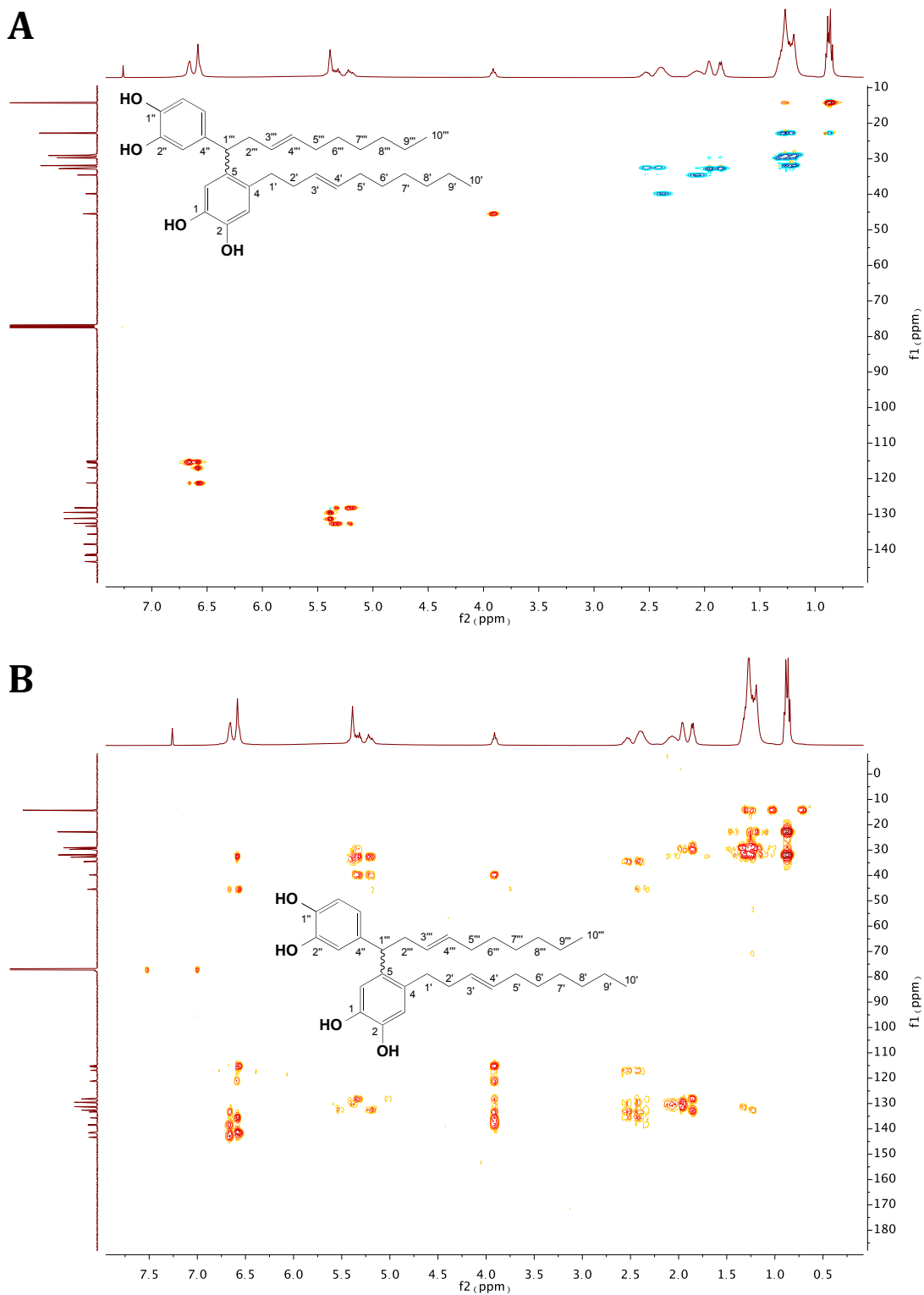
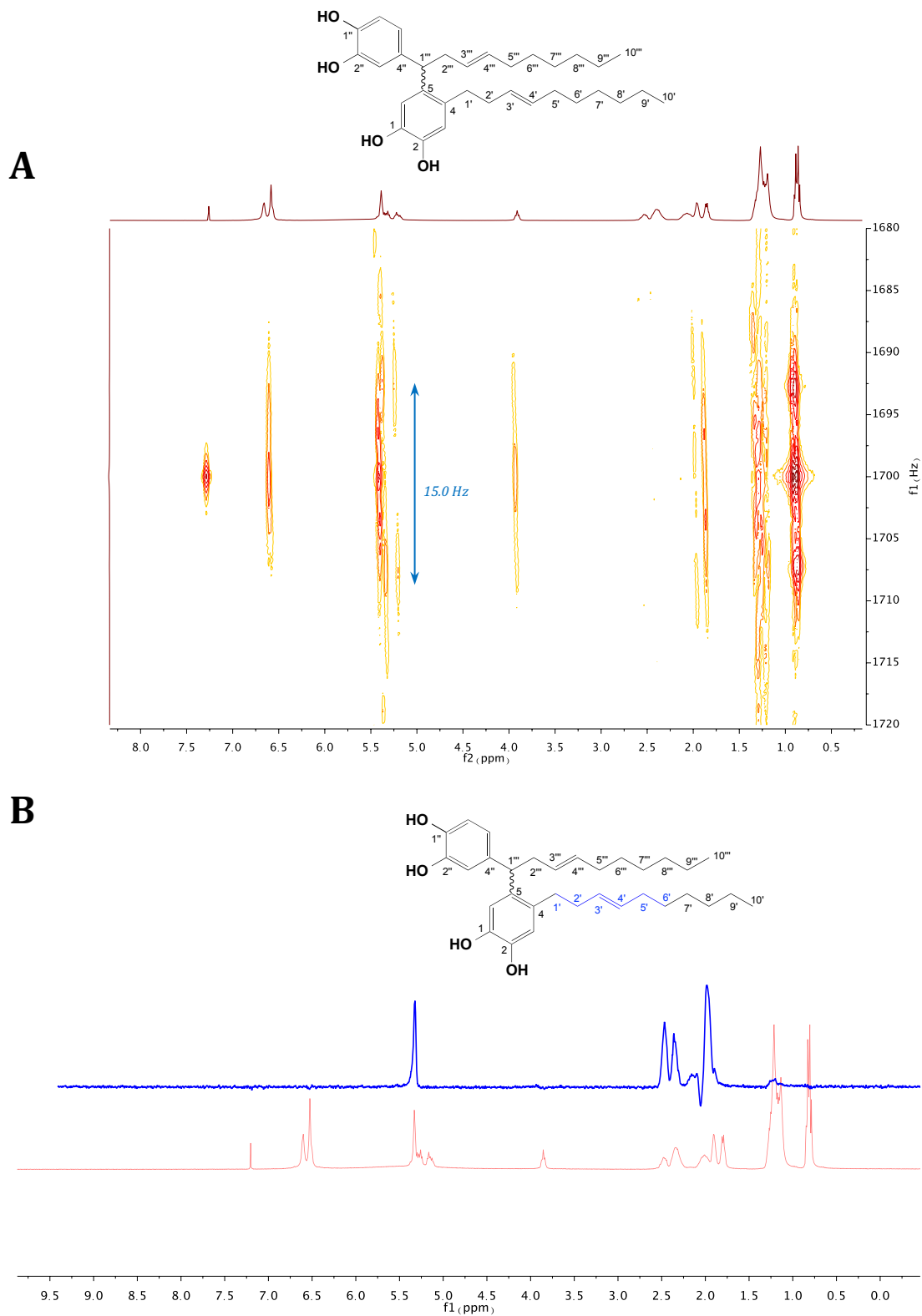
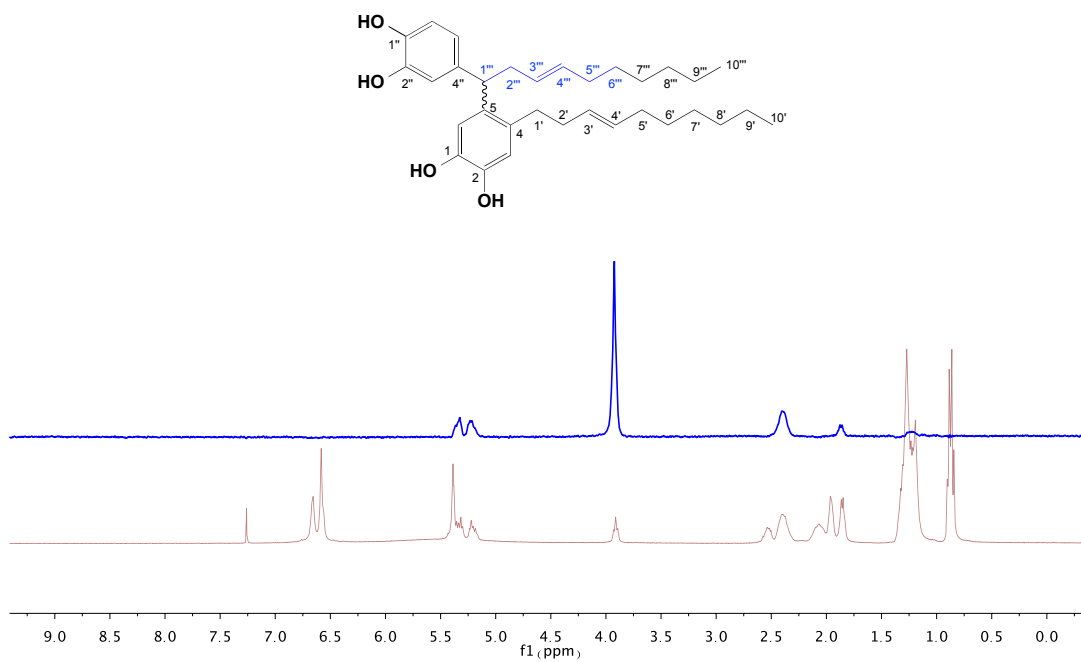


Figura IS.3-29: Experimento HSQC (A) y HMBC (B) para el compuesto 7.



**Figura IS.3-30:** Experimentos J-Resolved (**A**) y TOCSY-Selectivo (**B**) a  $\delta_{\text{H}}$  2.54 en H-1' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (rojo) para el compuesto 7.



**Figura IS.3-31:** TOCSY-Selectivo a  $\delta_{\text{H}}$  3.91 en H-1'' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (rojo) para el compuesto 7.



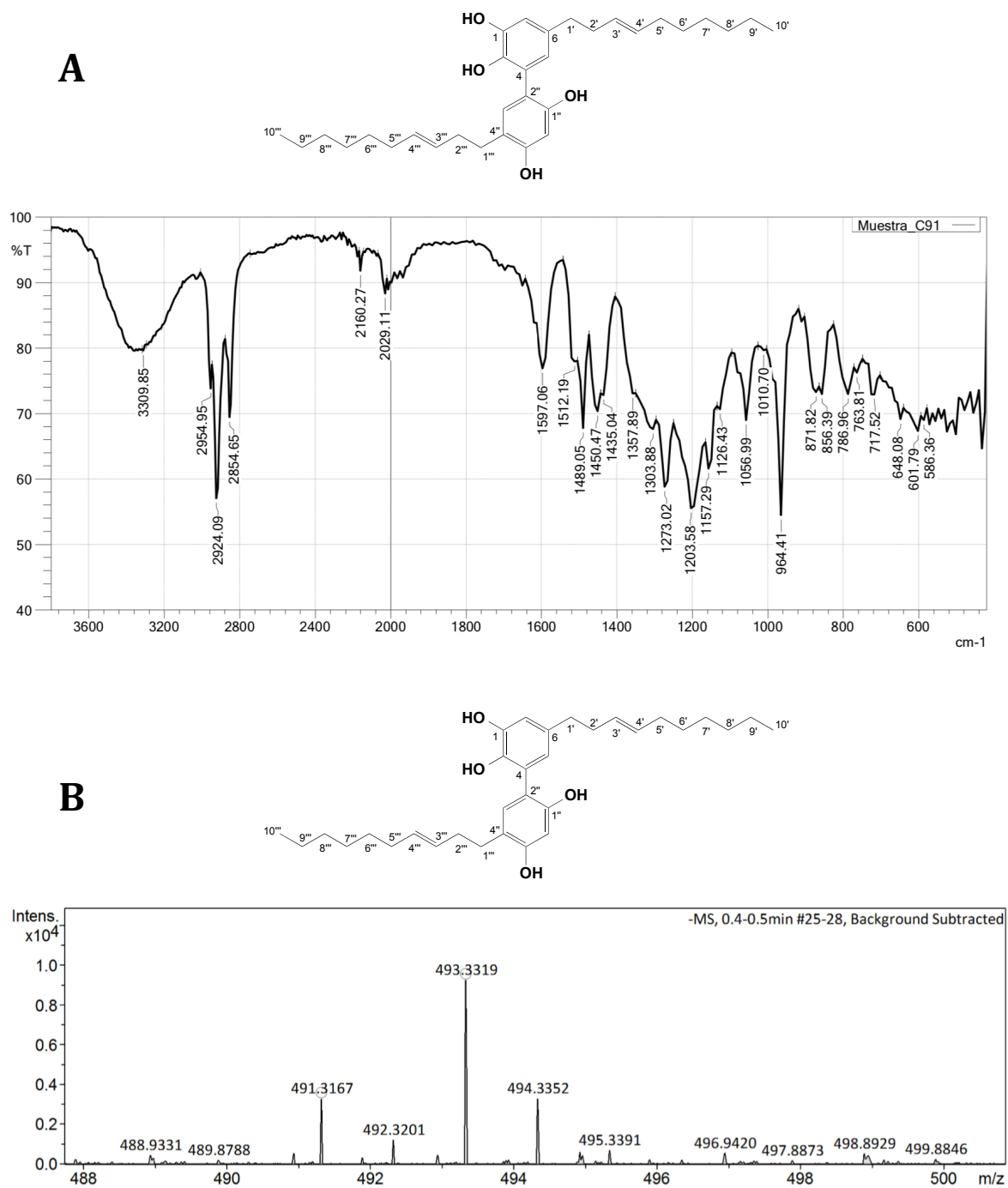
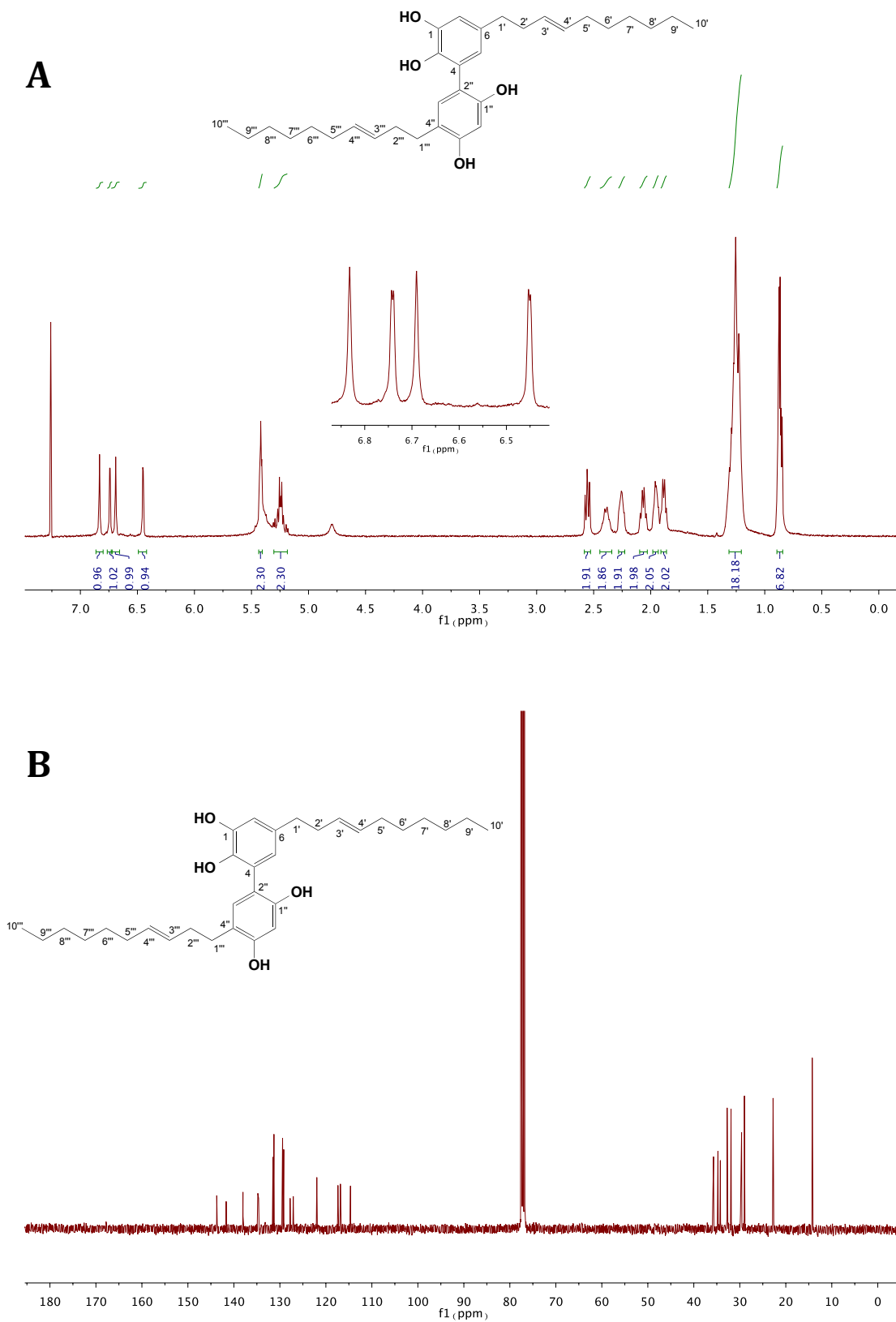


Figura IS.3-32: Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 8.



**Figura IS.3-33:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(A)** y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(B)** para el compuesto 8.

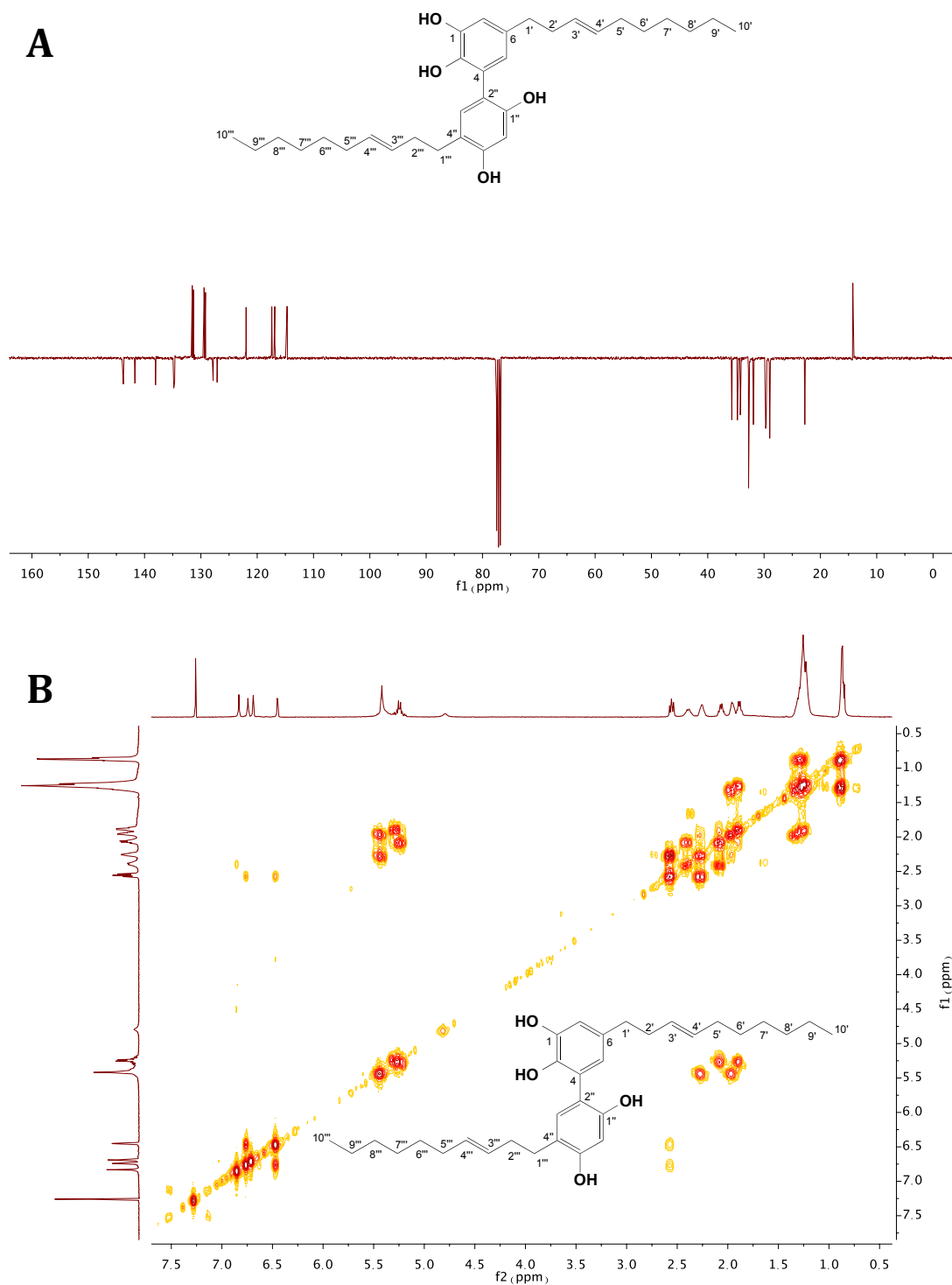


Figura IS.3-34: Experimento APT (A) y COSY (B) para el compuesto 8.

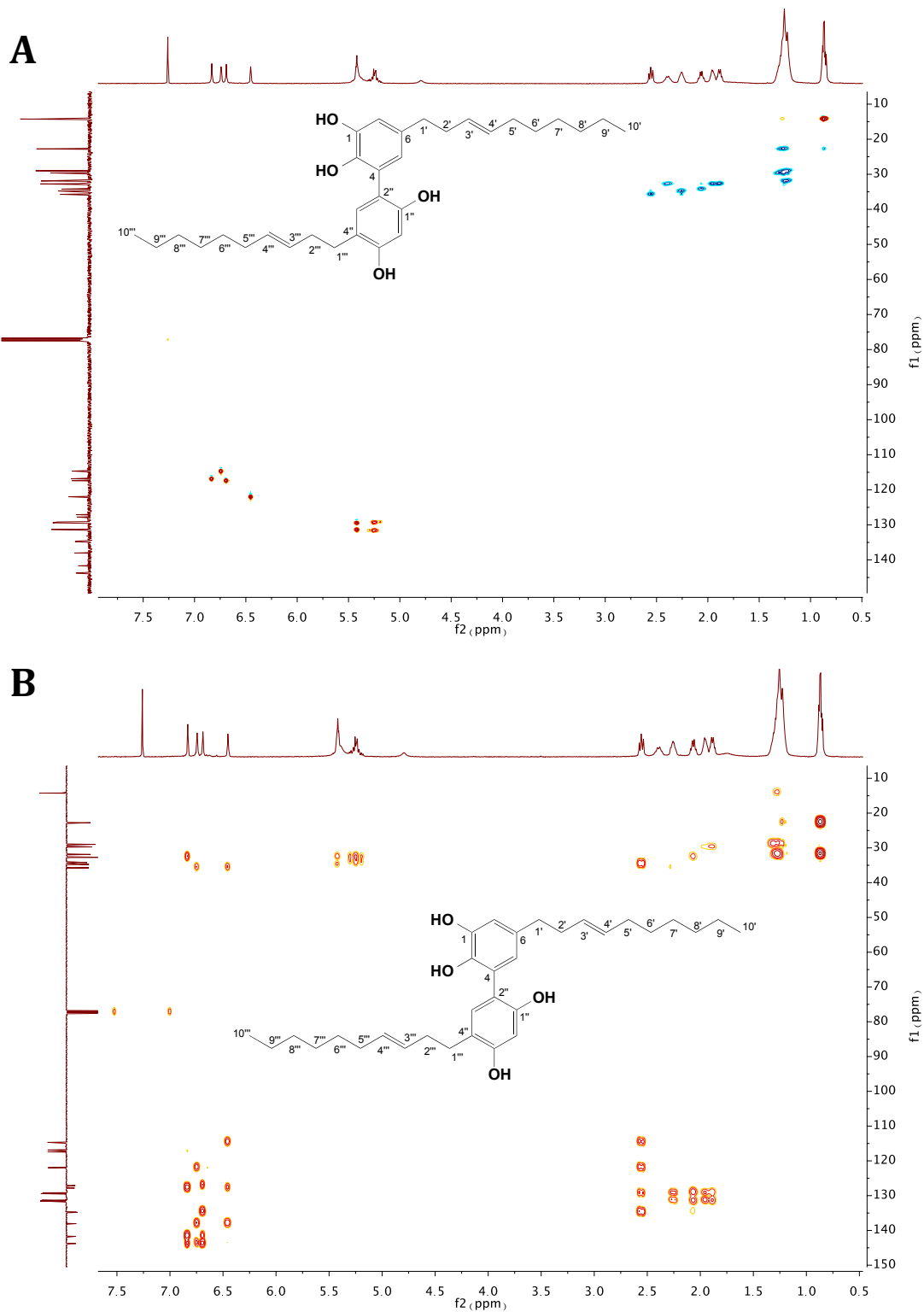
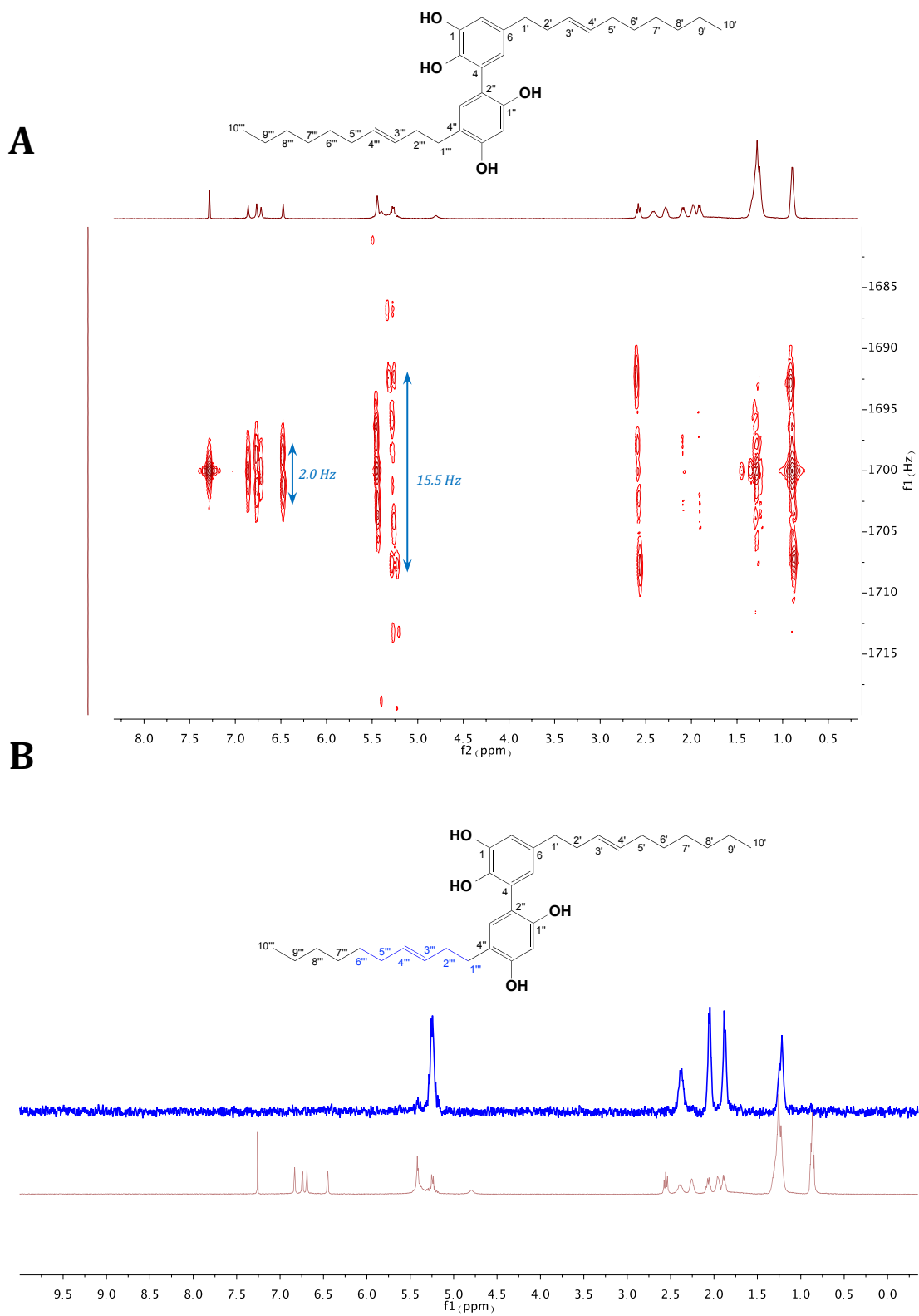
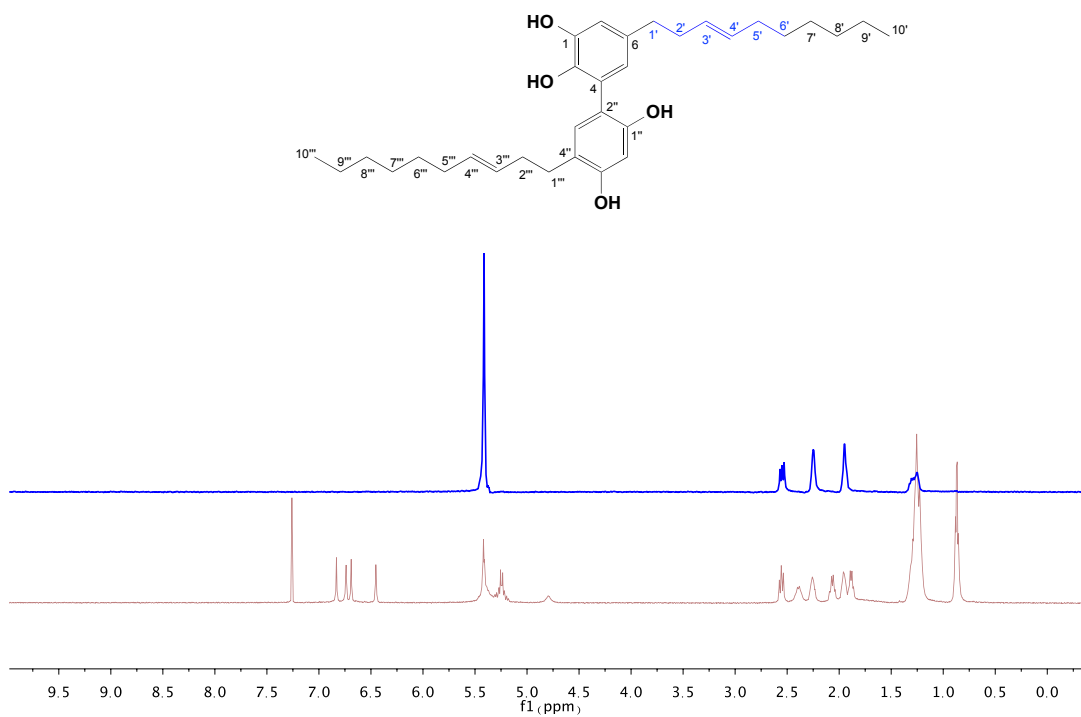


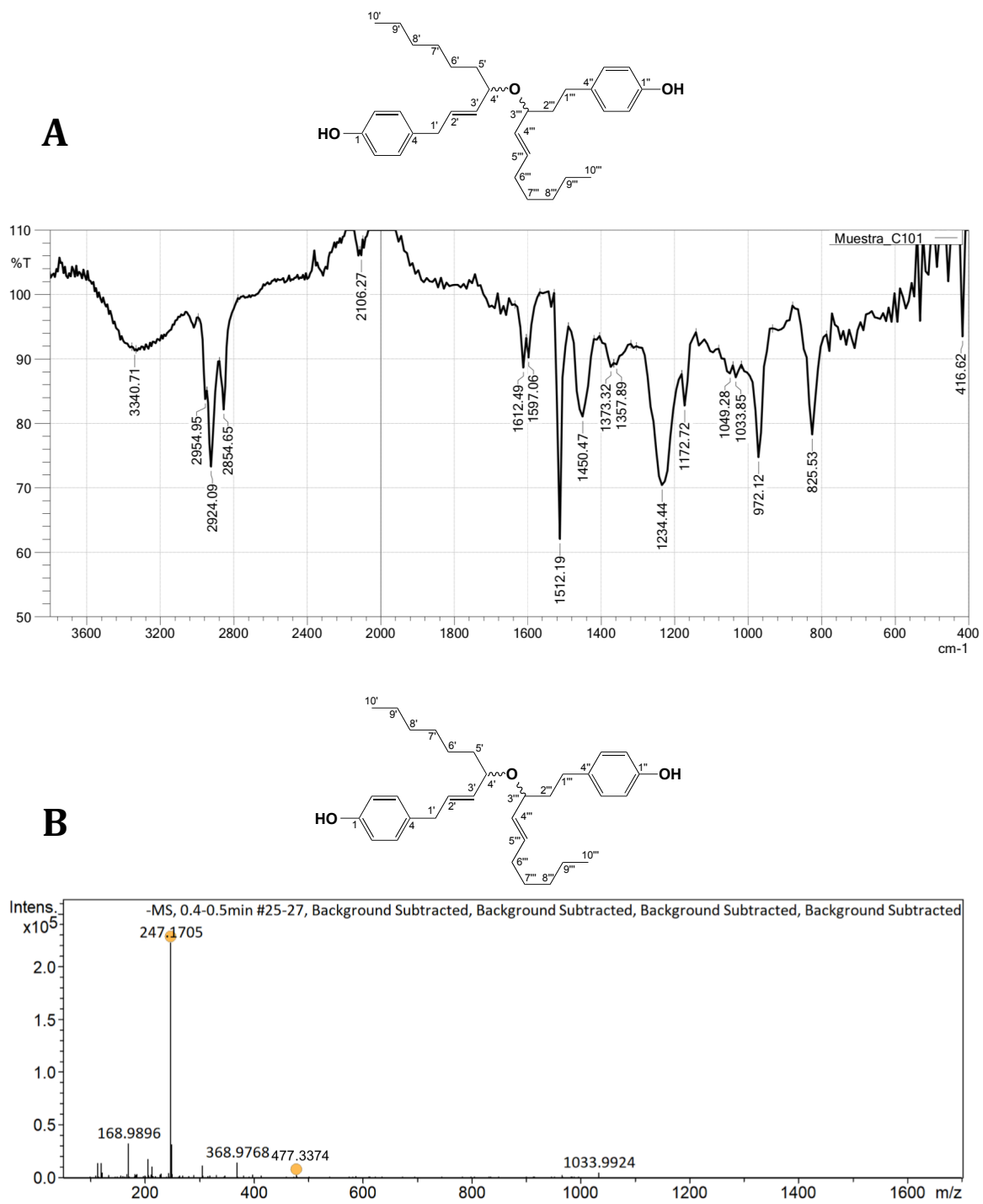
Figura IS.3-35: Experimento HSQC (A) y HMBC (B) para el compuesto 8.



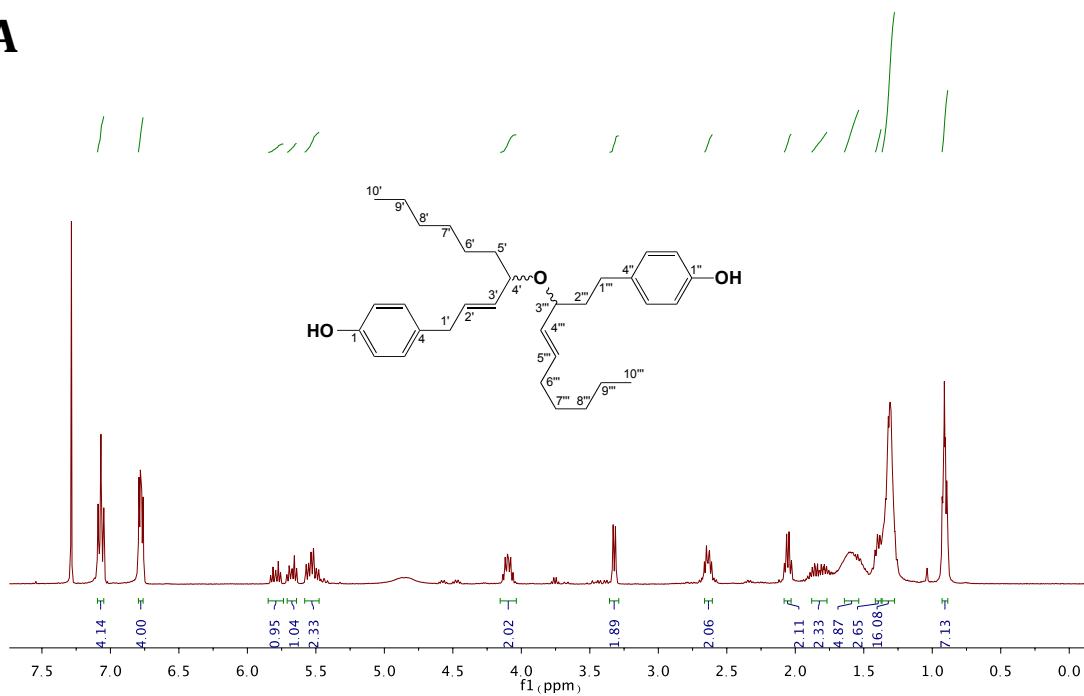
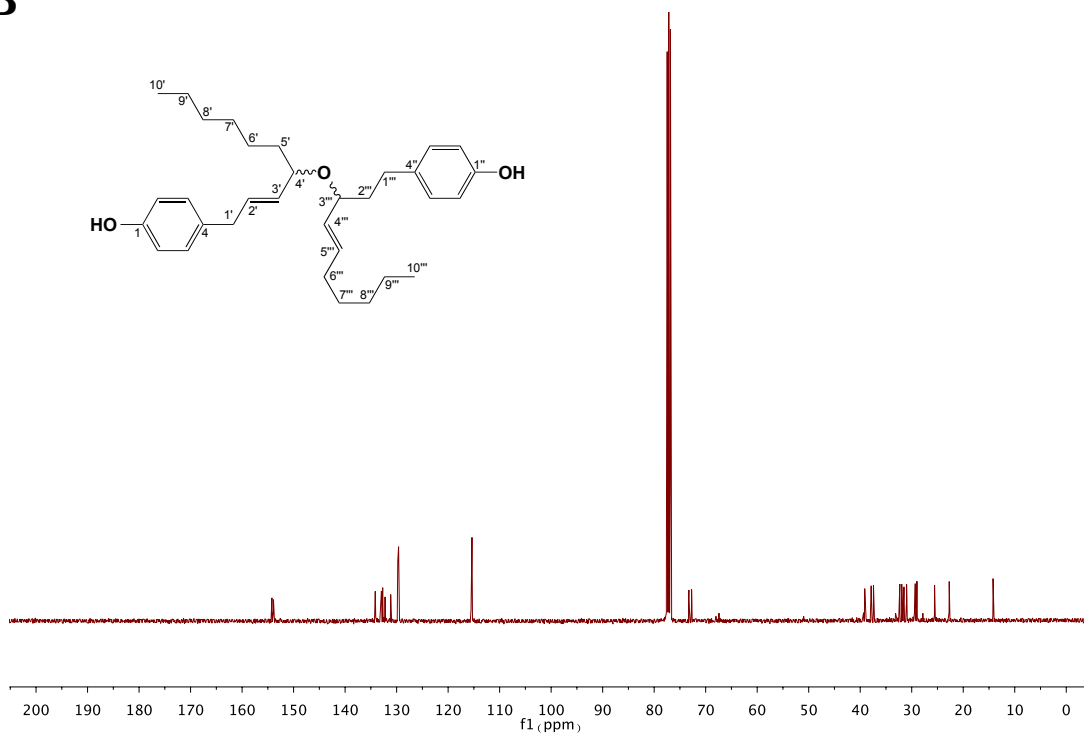
**Figura IS.3-36:** Experimentos J-Resolved (A) y TOCSY-Selectivo (B) a  $\delta_H$  5.25 en H-4''' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN  $^1H$  (rojo) para el compuesto 8.



**Figura IS.3-37:** TOCSY-Selectivo a  $\delta_{\text{H}} 5.42$  en H-4' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (rojo) para el compuesto 8.



**Figura IS.3-38:** Espectros IR (A) y HRESIMS (B) para el compuesto 9.

**A****B**

**Figura IS.3-39:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(A)** y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **(B)** para el compuesto 9.



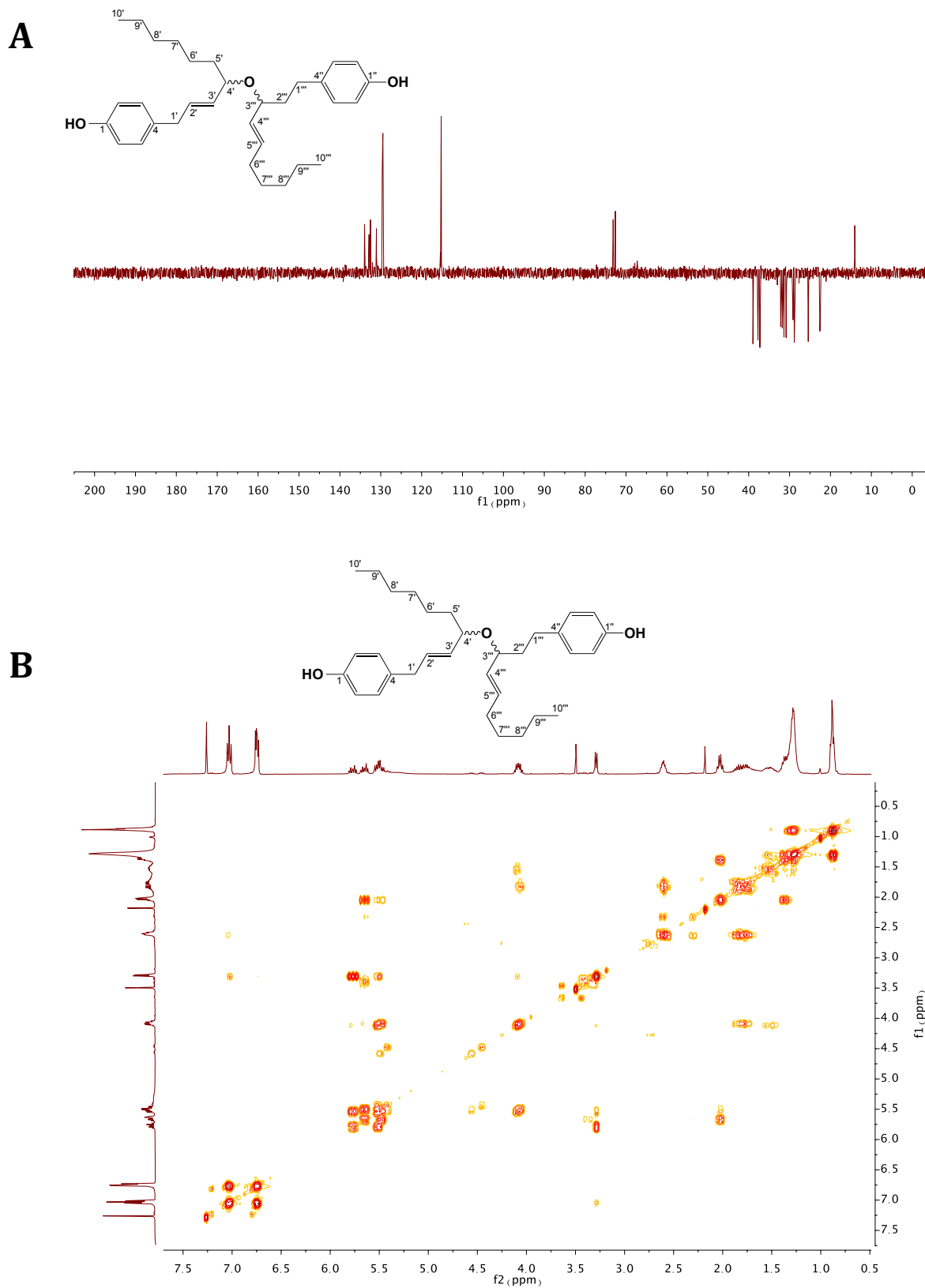


Figura IS.3-40: Experimento DEPT 135 (A) y COSY (B) para el compuesto 9.

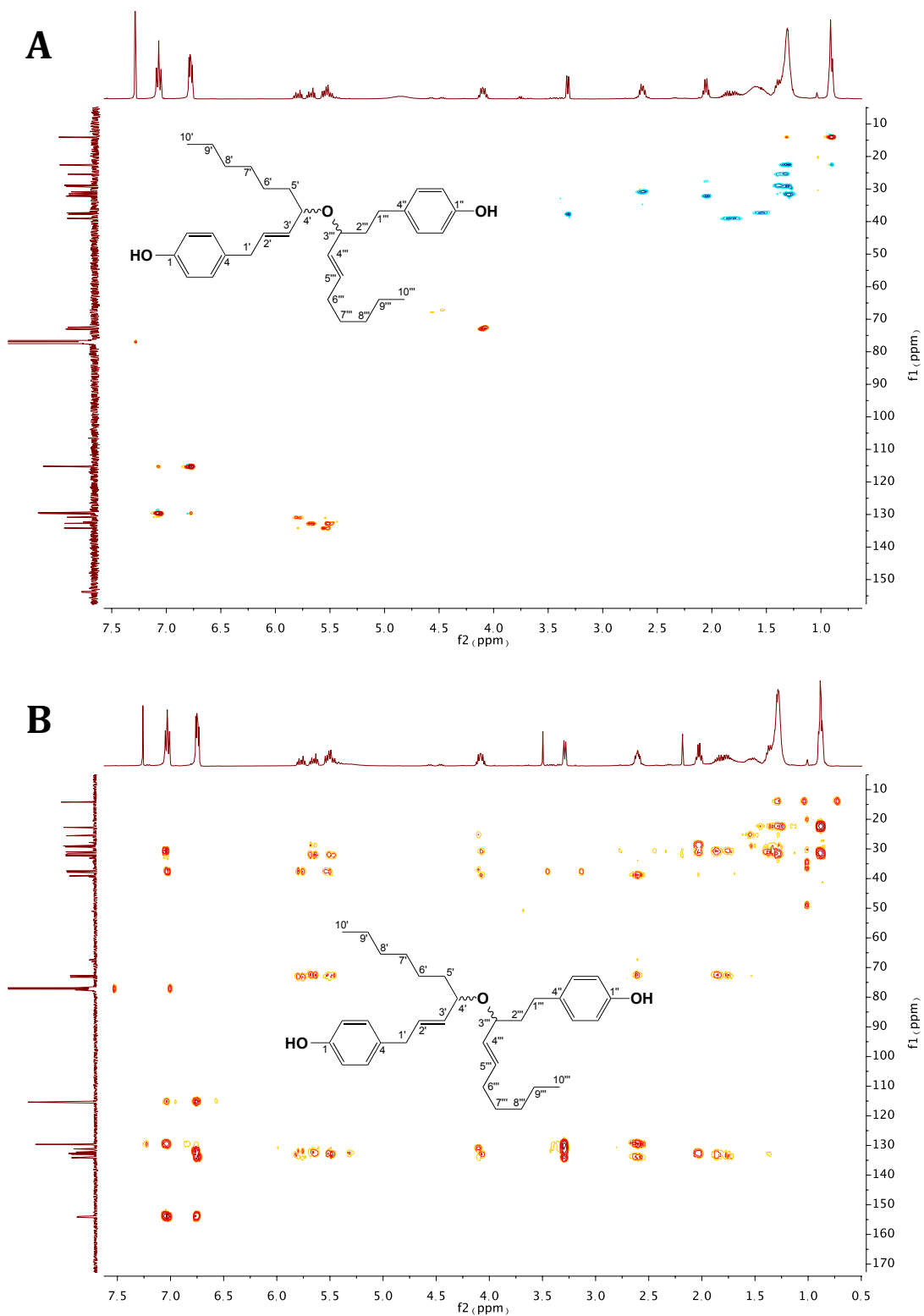
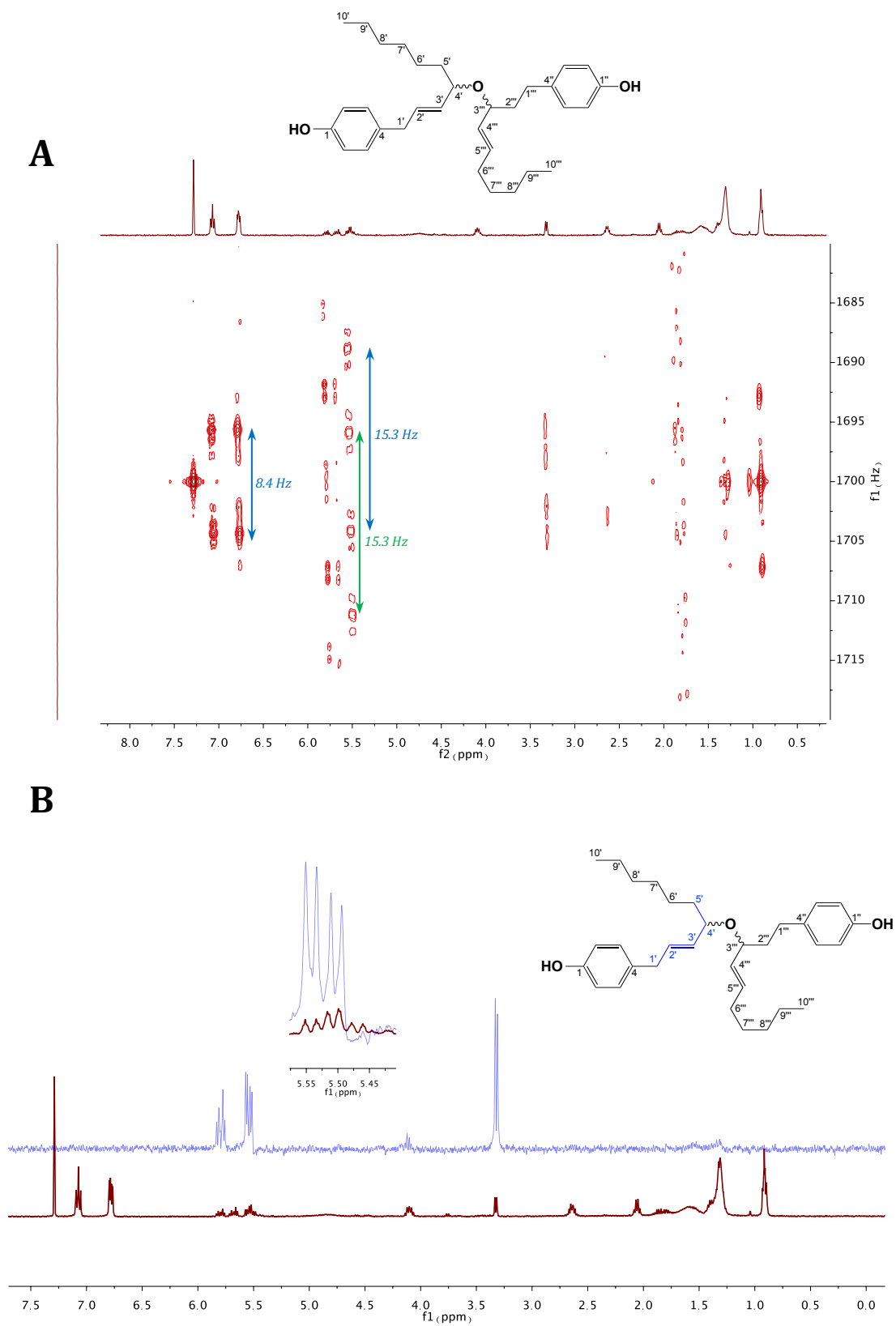
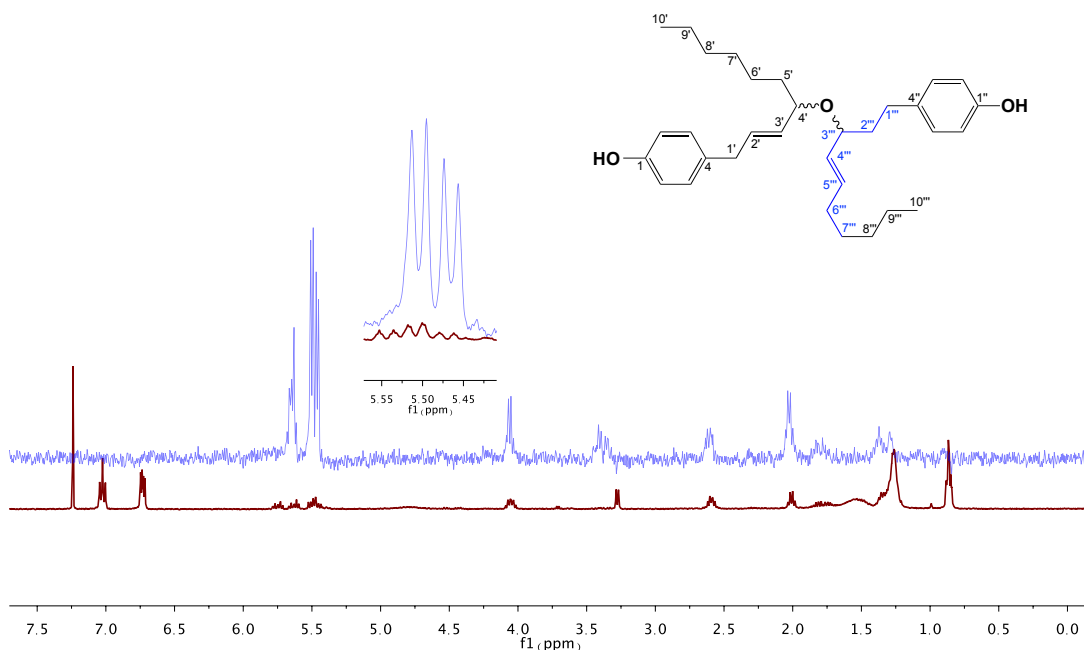
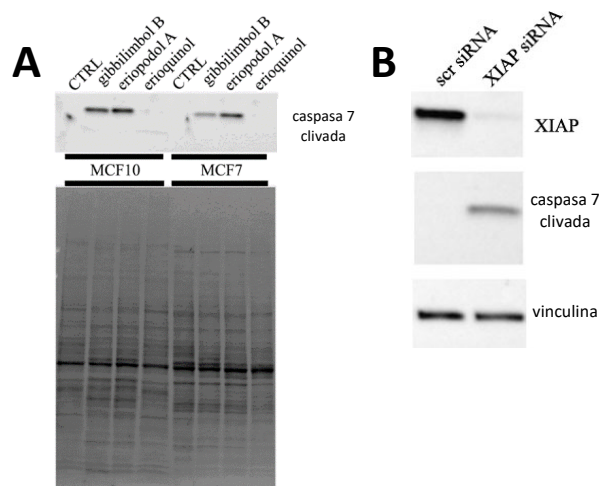


Figura IS.3-41: Experimento HSQC (A) y HMBC (B) para el compuesto 9.

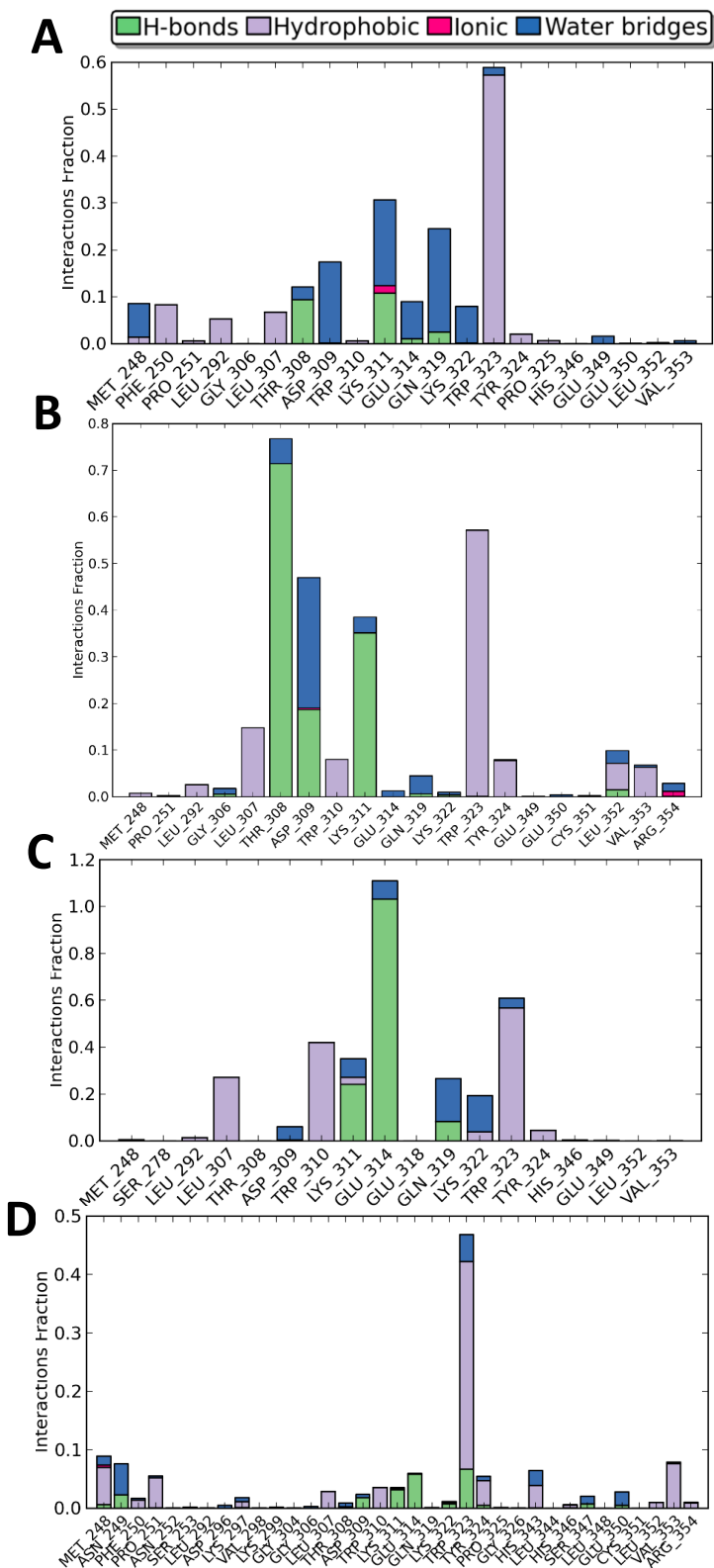




**Figura IS.3-43:** TOCSY-Selectivo a  $\delta_H$  5.65 en H-5''' (azul) superpuesto sobre el espectro de RMN  $^1H$  (rojo) para el compuesto 9.



**Figura IS.4-44:** (A) Análisis por western blot de caspasa 7 clivada en células MCF10 y MCF7 tratadas por 6 h en ausencia (CTRL) o en presencia de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gibbilibol B/eriopodol A o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de erioquinol. El gel de carga fue utilizado como control. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (B) Análisis por western blot de XIAP y caspasa 7 clivada en células MCF7 transfectadas con un siRNA control o específico para XIAP durante 24 h a concentración de 100 nM, utilizando vinculina como control. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes.



**Figura IS.4-45:** Proporción de las interacciones del ligando con la proteína, durante la dinámica molecular de 50 ns entre la proteína XIAP y los compuestos (A) embelina, (B) erioquinol, (C) eriopodol A y (D) gibbilimbol B.



