



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Búsqueda de compuestos bioactivos en las plantas medicinales
Porophyllum ruderale subsp. *macrocephalum* y *Tournefortia
hirsutissima* L.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Israel Hurtado Díaz

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber


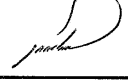
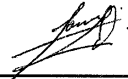

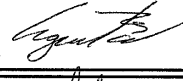

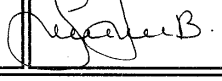
CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2019

**DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Búsqueda de compuestos bioactivos en las plantas medicinales *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* y *Tournefortia hirsutissima* L." que presenta el alumno Israel Hurtado Díaz (5620130608) para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas IQ-UNAM	Aprobado	
Dr. Ismael León Rivera CIQ-UAEM	Aprobado	
Dr. Jaime Escalante García CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto FF-UAEM	Aprobado	
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	

La presente tesis de doctorado se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Laura Patricia Alvarez Berber con fondos del proyecto CB240801 y la beca de posgrado no. 412787, ambos de CONACYT. Los espectros de RMN y de masas se obtuvieron en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (CONACYT 294406).

La investigación fitoquímica, se llevó a cabo en el laboratorio 321 del Centro de Investigaciones Químicas-IICBA de la UAEM.



Las evaluaciones farmacológicas en las células RAW 264.7 se realizaron en la Facultad de Farmacia de la UAEM en colaboración con la Dra. Judith González Christen y el Dr. Antonio Romero Estrada y las evaluaciones farmacológicas en células de cáncer en la Facultad de Farmacia de la UAEM en colaboración con la Dra. Leticia González Maya y la Dra. Jessica Nayelly Sánchez Carranza.



Parte de los resultados que se generaron para esta tesis fueron publicados como un artículo científico (ver anexo):

Hurtado-Díaz, I., Sánchez-Carranza, J. N., Romero-Estrada, A., González-Maya, L., González-Christen, J., Herrera-Ruiz, M. and Alvarez, L., 2019. 16-Hydroxy-Lycopersene, a Polyisoprenoid Alcohol Isolated from *Tournefortia hirsutissima*, Inhibits Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Cells and Induces Apoptosis in Hep3B Cells. *Molecules*, 24(13), 2366. Doi:10.3390/molecules24132366.

Además, se presentaron en la modalidad de cartel en los siguientes foros:

13^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Morelia, Michoacán, México, 2017. Cartel: Derivados de tiofeno de *Porophyllum ruderale* con actividad citotóxica.

14^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Cuernavaca, Morelos, México, 2018. Cartel: Inhibición de la producción de Óxido Nítrico de *Tournefortia hirsutissima* en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

DEDICATORIAS

A mis padres

Gerardo Hurtado Sil y Rosario Díaz Medina

A mi esposa

Diana G. Valdez Acosta

A mis hijos

Santiago Hurtado Valdez

Iktan Mateo Hurtado Valdez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo invaluable y su amor.

A Diana, por tu amor y estar a mi lado en las buenas y en las malas. Me has dado mucho apoyo y demasiados momentos muy gratos.

A mis hijos, por su amor y compartir conmigo muchas alegrías.

A mis hermanos, por su apoyo el cual aporta para que yo siga adelante.

A la Dra. Laura P. Alvarez Berber, por su apoyo para la realización de este proyecto, su confianza en mí y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Berenice Aguilar Guadarrama, Dr. Samuel Estrada Soto y Dra. Laura P. Alvarez Beber, por sus sugerencias y enseñanzas durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al jurado revisor: Dr. Guillermo Delgado Lamas, Dr. Ismael León Rivera, Dr. Jaime Escalante García, Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez, Dra. Berenice Aguilar Guadarrama, Dr. Samuel Estrada Soto y Dra. Laura P. Alvarez Beber, por su gran aportación en conocimiento y experiencia para la corrección de esta tesis.

A quienes colaboraron con mi trabajo apoyándome en la realización de los ensayos farmacológicos: Dra. Jessica Nayelly Sánchez Carranza, Dra. Judith González Christen, Dr. Antonio Romero Estrada y Dra. Leticia González Maya.

A mis amigos, compañeros y colegas: Ninfa, Maritza, Mayra, Antonio, Araceli, Maestra Silvia, Claribel, Isis, Diana, Manuel, Cynthia, Mariana, Carla, Aurora, Jessi, Fidel e Ivonne por las experiencias vividas y su gran ayuda.

Al Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitirme el acceso a su infraestructura, y al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas por sus servicios analíticos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca no. 412787.

Al personal administrativo: Mayumi, Cristina, Vero y Marlen por su valioso trabajo y sus amables atenciones.

Al personal técnico del CIQ: Dr. Raúl Villamil, Maestra Cristina Rodríguez, Técnica María Medina, Dra. Blanca Eda y Dr. Alfonso Miranda por su valioso trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Las plantas medicinales como fuente de compuestos bioactivos.....	4
2.2 Cáncer.....	5
2.2.1 Epidemiología del cáncer.....	6
2.3 Apoptosis.....	7
2.3.1 Morfología de la apoptosis.....	7
2.3.2 Apoptosis vs Necrosis.....	8
2.3.3 Mecanismos de la apoptosis.....	9
2.3.4 Vía extrínseca.....	9
2.3.5 Vía intrínseca.....	10
2.3.6 Desregulación de la apoptosis.....	12
2.4 Estrategias para el tratamiento del cáncer dirigidas a la apoptosis.....	13
2.4.1 Estrategias dirigidas a la familia de proteínas Bcl-2.....	13
2.4.2 Terapia de fármacos dirigida a p53.....	15
2.4.3 Terapia de fármacos basada en las caspasas.....	15
2.4.4 Productos naturales en la quimioterapia del cáncer.....	16
2.5 Inflamación.....	17
2.5.1 Mecanismos de la inflamación.....	18
2.6 Inflamación y cáncer.....	19
2.6.1 Los mecanismos para la asociación entre la inflamación y el cáncer.....	20
2.6.2 El papel del óxido nítrico en la inflamación y el cáncer.....	21
2.7 Características de las líneas celulares utilizadas en el presente estudio....	22
2.8 Información de las especies vegetales en estudio.....	26
2.8.1 Generalidades de <i>Porophyllum ruderale</i> subsp. <i>macrocephalum</i>	26
2.8.2 Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>P. ruderale</i>	28
2.8.3 Generalidades de <i>Tournefortia hirsutissima</i> L.....	29
2.8.4 Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>T. hirsutissima</i>	30
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPOTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 <i>Porophyllum ruderale</i> subsp. <i>macrocephalum</i>	34
6.1.1 Purificación y caracterización de los derivados de tiofeno (1-3)	34
6.1.1.1 α -2,2':5',2''-tertiofeno (1)	35
6.1.1.2 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2)	37
6.1.1.3 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (3)	41

6.1.2 Actividad antiproliferativa de los derivados de tiofeno (1-3)	44
6.1.3 Efecto de los derivados de tiofeno (1-3) sobre el ciclo celular.....	45
6.2 <i>Tournefortia hirsutissima</i>	47
6.2.1 Actividades antiinflamatorias de <i>Tournefortia hirsutissima</i>	47
6.2.1.1 Evaluación <i>in vivo</i>	47
6.2.1.2 Evaluación <i>in vitro</i>	48
6.2.2 Actividad antiproliferativa de <i>Tournefortia hirsutissima</i>	51
6.2.3 Estudio químico biodirigido de <i>Tournefortia hirsutissima</i>	51
6.2.4 Caracterización de los alcoholes poliisoprenoides 4-6... ..	54
6.2.4.1 (R)-16-hidroxi-licoperseno (4)	55
6.2.4.2 (Z ₈ ,E ₃ ,ω)-dodecaprenol (5) y (Z ₉ ,E ₃ ,ω)-tridecaprenol (6).....	66
6.2.5 Actividad antiinflamatoria de los alcoholes poliisoprenoides (4-6) ...	67
6.2.6 Actividad antiproliferativa de los alcoholes poliisoprenoides (4-6) ...	68
6.2.7 Actividad apoptótica de (R)-16-hidroxy-licoperseno.....	69
7. PARTE EXPERIMENTAL	75
7.1 Procedimientos experimentales generales.....	75
7.2 Colecta del material vegetal.....	76
7.2.1 Colecta de <i>Porophyllum ruderale</i>	76
7.2.2 Colecta de <i>Tournefortia hirsutissima</i>	76
7.3 Preparación de los extractos.....	76
7.3.1 Obtención de extractos de <i>Porophyllum ruderale</i>	76
7.3.2 Obtención de extractos de <i>Tournefortia hirsutissima</i>	76
7.4 Aislamiento de los derivados de tiofeno (1-3)	77
7.5 Estudio fitoquímico biodirigido de <i>Tournefortia hirsutissima</i>	78
7.5.1 Aislamiento de los alcoholes poliisoprenoides (4-6)	78
7.6 Preparación de los ésteres (S) y (R)-MTPA de 4 (4a y 4b)	80
7.7 Viabilidad celular de las células RAW 264.7.....	80
7.8 Medición de la concentración de Nitrito.....	81
7.9 Edema en oreja de ratón inducido por TPA.....	81
7.10 Ensayo antiproliferativo.....	82
7.11 Análisis del ciclo celular.....	82
7.12 Estudio de la muerte celular por tinción con Anexina V y IP.....	83
7.13 Observación de la morfología celular.....	83
7.14 RT-PCR.....	84
7.15 Actividad de las caspasas 3/7.....	84
7.16 Análisis estadístico.....	84
8. CONCLUSIONES	85
9. PERSPECTIVAS	86
10. REFERENCIAS	87
11. ANEXO	95

INDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Distribución de nuevos casos de cáncer (incidencia) y muertes (mortalidad) por área mundial en 2018 para ambos sexos. Esta Ilustración fue tomada de Bray *et al.* 2018 y adaptada para esta tesis.....6
- Figura 2.2.** Vía intrínseca de la apoptosis. Las flechas representan la activación y las barras T representan la inhibición. Esta ilustración fue tomada de Claire M. Pfeffer and Amareshwar T. K. Singh, 2017 y adaptada para esta tesis.....11
- Figura 2.3.** Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular HepG2, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/HB-8065.aspx#characteristics>.....22
- Figura 2.4.** Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular A549, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#characteristics>.....23
- Figura 2.5.** Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular HeLa, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#characteristics>.....24
- Figura 2.6.** Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular PC3, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx#characteristics>.....25
- Figura 2.7.** Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular RAW 264.7, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/TIB-71.aspx#culturemethod>.....26
- Figura 2.8.** Imagen de la especie *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum*, tomada de: Diagnóstico del pápaloquelite en México, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. var. *macrocephalum* (DC.) Cronq. (Lara *et al.* 2011).....27
- Figura 2.9.** Fotos tomadas de *Tournefortia hirsutissima* L. (Izquierda: tallo y hoja; derecha: flores) en el municipio de Yautepec, Morelos.....30

Figura 6.1. Cromatograma de la fracción F2 mediante CLAE a nivel analítico, monitoreado a 364 nm utilizando una columna Merck (Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm).....	35
Figura 6.2. Espectro de masas por impacto electrónico de 2,2':5',2''-tertiofeno (1).....	36
Figura 6.3. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 2,2':5',2''-tertiofeno (1) en negro y expansiones en azul.....	36
Figura 6.4. Espectro de masas por impacto electrónico (IE) de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).....	38
Figura 6.5. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2) en negro y expansiones de la región aromática en azul.....	38
Figura 6.6. Región aromática del espectro COSY de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).....	39
Figura 6.7. Región del sistema ABX del espectro COSY de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).....	40
Figura 6.8. Espectro HMBC de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).....	41
Figura 6.9. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (3) en negro y expansiones en azul.	42
Figura 6.10. Expansión del espectro HMBC de 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (3).....	43
Figura 6.11. Espectro de masas por impacto electrónico (IE) de 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (3).....	43
Figura 6.12. Ciclo celular de las células Hep3B después del tratamiento con los compuestos 1-3 a su CI ₅₀ durante 24 h mediante citometría de flujo. A) Control y compuestos 1 y 2 , B) Control, compuesto 3 y paclitaxel (PTX) a 10 nM.....	47
Figura 6.13. Efecto de inhibición del edema inducido por TPA en la oreja de ratón, de los extractos de <i>n</i> -hexano (H-Th), diclorometano (D-Th) e hidroalcohólico (HA-Th) de las hojas de <i>T. hirsutissima</i> e Indometacina a dosis de 1 mg/oreja.....	48

Figura 6.14. Efecto de los extractos de H-Th, D-Th e HA-Th y las fracciones F4, F4-1, F4-2 y F4-4 sobre la inhibición de la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.	49
Figura 6.15. Efecto de los extractos de H-Th, D-Th e HA-Th y las fracciones F4, F5, F4-1, F4-2 y F4-4 a las dosis indicadas sobre la viabilidad celular de las células RAW 264.7 utilizando el ensayo de MTS.....	50
Figura 6.16. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del extracto de hexano de las hojas de <i>T. hirsutissima</i> en negro y expansiones en azul.....	52
Figura 6.17. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) del extracto de hexano de las hojas de <i>T. hirsutissima</i>	53
Figura 6.18 Cromatograma de F4-2-2 mediante CLAE a nivel analítico, monitoreado a 210 nm utilizando la columna Merck (Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm).....	54
Figura 6.19. Expansión del espectro de masas ESI/Q-TOF de alta resolución correspondiente al compuesto (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4).....	55
Figura 6.20. Expansiones del espectro de RMN ¹ H (500 MHz, benceno-d ₆) del compuesto (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4).....	56
Figura 6.21. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, benceno-d ₆) del compuesto (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4) en negro y sus expansiones de las regiones de los carbonos <i>sp</i> ² y de metilos vinílicos en azul.....	57
Figura 6.22. Expansiones del espectro COSY de (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4)....	59
Figura 6.23. Asignaciones de RMN ¹ H de (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4).....	61
Figura 6.24. Expansiones del espectro HSQC de (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4)....	62
Figura 6.25. Expansiones del espectro HMBC de (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4)....	63
Figura 6.26. Estructura del compuesto (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4) representando las ocho unidades de prenilo.....	64

Figura 6.27. Pasos experimentales y modelo para determinar la configuración absoluta del compuesto 4	65
Figura 6.28. A) Efecto de los compuestos 4–6 a las concentraciones de 3.75, 7.5, 15, 30 y 60 µg/mL, sobre la viabilidad celular de células RAW 264.7 mediante un ensayo de MTS.....	68
Figura 6.29. Ciclo celular de las células Hep3B (A), HepG2 (B), PC3 (C) y HeLa (D) mediante citometría de flujo después del tratamiento con el compuesto 4 a su CI_{50} durante 72 h y Paclitaxel (PTX) a 10 nM.....	70
Figura 6.30. Análisis de la muerte celular por citometría de flujo utilizando tinción con Anexina V/IP.....	71
Figura 6.31. Análisis de la muerte celular de las células Hep3B utilizando microscopía de fluorescencia. A) Control negativo (sin tratamiento). B) Células tratadas con el compuesto 4 a 21.3 µM (12 µg/mL) durante 72 h. C) Células tratadas con el control positivo de la apoptosis H_2O_2 . D) Control de necrosis.....	72
Figura 6.32. Efecto del compuesto 4 a 21.3 µM durante 72 h, sobre los niveles de expresión de ARNm de Bcl-2 y Bax en la línea celular HepB3. Se usó PTX (20 nM) como control positivo. GAPDH fue utilizado como un control interno.....	73
Figura 6.33 Activación de las caspasas 3/7 después del tratamiento con (<i>R</i>)-16-hidroxi-licoperseno (4) a 21.3 µM durante 72 h y el control positivo PTX (20 nM) en la línea celular Hep3B. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control.....	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 6.1 Valores de CI_{50} en µg/mL de los derivados de tiofeno 1–3 contra 4 líneas celulares de cáncer humano y una no cancerosa (IHH).....	45
Tabla 6.2 Datos de RMN 1H (500 MHz) y $^{13}C^*$ (126 MHz) del compuesto 4 en C_6D_6	58
Tabla 6.3 Valores CI_{50} en µM de 4–6 contra 4 líneas celulares de cáncer y una no cancerosa (IHH).....	69

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

MHz	Megahertz
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
^1H	Proton
^{13}C	Carbono 13
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPTQ	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer Including the Detection of Quaternary Nuclei
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
benceno- d_6	Benceno hexadeuterado
C_6D_6	Benceno hexadeuterado
CDCl_3	Cloroformo deuterado
d	Doblete
dd	Doble de dobles
t	Triplete
δ	partes por millon (ppm)
EM	Espectrometría de masas
ESI/Q-TOF	Electrospray Ionisation/quadrupole-time-of-flight
IE	Impacto electrónico
m/z	relación masa/carga
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH_3OH	Metanol
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
Fase C18.	Fase estacionaria de gel de sílice enlazada a octadesilsilano

H ₂ O	Agua
AcOEt	Acetato de Etilo
iPrOH	Isopropanol
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
ANOVA	Análisis de la varianza
UV	Ultravioleta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados Celcius
[α] _D	Actividad Optica
μm	Micrometros
μM	Micromolar
μg/mL	Microgramos/mililitro
BrEt	Bromuro de Etidio
Cl ₅₀	Concentración Inhibitoria media
COX-2	Cicloxigenasa dos
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina diez
LPS	Lipopolisacárido
NF-κB	Factor nuclear <i>kappa</i> B
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico

RESUMEN

Porophyllum ruderale subsp. *macrocephalum*, se conoce comúnmente como pápalo y es una planta medicinal y comestible. En este estudio, a partir de esta especie, se purificaron tres compuestos derivados de tiofeno (**1–3**) y se identificaron por RMN y EM. Posteriormente, se evaluó la actividad antiproliferativa de **1–3** sobre las líneas celulares de cáncer humano HepG2 y Hep3B (hepatocelular), A549 (pulmón) y HeLa (cérvix), y la línea IHH no cancerosa. Los compuestos **1–3** presentaron mayor actividad antiproliferativa en las células de cáncer (CI_{50} desde 3.6 ± 0.3 hasta 30 ± 7 $\mu\text{g/mL}$), que en las células IHH (CI_{50} desde 57 ± 3 hasta 100 ± 10 $\mu\text{g/mL}$). Destaca la actividad del compuesto **1** sobre las células Hep3B con una $CI_{50} = 3.6 \pm 0.3$ $\mu\text{g/mL}$. La evaluación de **1–3** sobre la progresión del ciclo celular en las células Hep3B, mostró que el compuesto **1** induce un incremento en subG₁; sin embargo, no induce detención de las fases G₁, S o G₂/M. En contraste, el compuesto **3**, presentó una $CI_{50} = 15 \pm 3$ $\mu\text{g/mL}$ e induce un incremento en subG₁ y la detención de la fase G₂/M. Estos resultados sugieren que estos derivados de tiofeno actúan sobre diferentes mecanismos de acción.

Por otra parte, a partir de la planta medicinal, *Tournefortia hirsutissima* L. (hierba rasposa) se aislaron tres alcoholes poliisoprenoides (**4–6**) mediante un fraccionamiento dirigido por la inhibición del NO en las células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Los compuestos **4–6** se identificaron por RMN y EM, y la configuración absoluta del compuesto **4** en C-16 se determinó por el método de Mosher. Posteriormente, **4–6** se evaluaron para su actividad inhibitoria del NO, y su actividad antiproliferativa en las células de cáncer humano HeLa, PC3 (próstata), HepG2 y Hep3B, y la línea IHH. Los compuestos **5** y **6** no presentaron actividad en la inhibición del NO, sin embargo, **4** inhibió significativamente su producción ($28.5 \pm 1.5\%$ a 14.4 $\mu\text{g/mL}$). Respecto a la actividad antiproliferativa; el compuesto **4** presentó la mayor actividad contra las células cancerosas y la menor actividad contra las células IHH no cancerosas. El compuesto **4**, se investigó en el ciclo celular de las células Hep3B ($CI_{50} = 12 \pm 2$ $\mu\text{g/mL}$); indujo un incremento de subG₁, lo que sugiere la muerte celular. Se comprobó una muerte apoptótica mediante la tinción de naranja de acridina/BrEt y de Anexina V-FITC/IP. Asimismo, se demostró que **4** induce un aumento en la proporción de Bax/Bcl2 y en la activación de las caspasas 3/7, sugiriendo muerte apoptótica por la vía mitocondrial.

ABSTRACT

Porophyllum ruderale subsp. *macrocephalum*, is commonly known as “pápalo”, it is an edible and medicinal plant. In this study, three thiophene derivatives (**1–3**) were isolated and purified from *P. ruderale*, and were identified by NMR spectroscopy and MS. Then, the antiproliferative activity of **1–3** in the human cancer HepG2 and Hep3B (hepatocellular), A549 (lung) y HeLa (cervix) cell lines, and in the IHH non-cancerous cells was evaluated. Compounds **1–3** showed higher antiproliferative activity in cancer cells (IC_{50} from 3.6 ± 0.3 to $30 \pm 7 \mu\text{g/mL}$), than in IHH cells (IC_{50} from 57 ± 3 to $100 \pm 10 \mu\text{g/mL}$). It is notable the activity of compound **1** in Hep3B cells with an $IC_{50} = 3.6 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. The evaluation of **1–3** on the progression of cell cycle in Hep3B cells evidenced that **1** increased subG₁; nevertheless, did not induce arrest on the G₁, S or G₂/M phases. In contrast, compound **3**, showed an $IC_{50} = 15 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ and induce an increase of subG₁ and an arrest of G₂/M phase. These results suggest that these thiophene derivatives act on different action mechanisms.

On the other hand, three polyisoprenoid alcohols (**4–6**) were isolated and purified from *Tournefortia hirsutissima* L. medicinal plant (commonly known as “hierba rasposa”) by a guided fractioning by the inhibitory activity of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Compounds **4–6** were identified by NMR spectroscopy and MS, and the absolute configuration of compound **4** at C-16 was determined by the Mosher’s method. Then, **4–6** were evaluated for their NO inhibitory activity, and their antiproliferative activity in the human cancer HeLa, PC3, HepG2 and Hep3B cells, and IHH line. Compounds **5** and **6** did not show activity in the inhibition of NO production, nevertheless, **4**, significantly inhibited their production ($28.5 \pm 1.5\%$ at $14.4 \mu\text{g/mL}$). Regarding the antiproliferative activity, compound **4** had the highest activity against cancer cells and the lowest activity against non-cancerous IHH cells. Compound **4** was investigated in the cell cycle of Hep3B cells ($IC_{50} = 12 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), induced an increase in subG₁, suggesting cell death. It was proved an apoptotic death by staining with acridine orange/ethidium bromide and Annexin V-FITC/PI. Additionally, it was demonstrated that apoptosis induced by compound **4** in Hep3b cells is associated with the increase of the ratio of Bax/Bcl-2, and the activation of caspases 3/7. These results suggested that **4** induce apoptotic cell death by the mitochondrial pathway.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales (en esta tesis, se hace referencia a las plantas medicinales, como aquellas que tienen un uso tradicional para el tratamiento o la cura de diversos padecimientos o enfermedades) se han utilizado contra diversas enfermedades durante miles de años, y el 80% de la población mundial sigue dependiendo de ellas (Parsaeimehr *et al.* 2017). Asimismo, las plantas medicinales son fuentes inestimables de compuestos bioactivos (Parsaeimehr *et al.* 2014). Actualmente, las plantas medicinales representan una de las fuentes principales para la búsqueda de compuestos para el desarrollo de posibles fármacos.

Debido a la importancia que tienen las plantas medicinales en la búsqueda de compuestos para el tratamiento de diversas enfermedades, en la presente tesis, se propuso realizar el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antiproliferativa y antiinflamatoria a partir de las especies *Porophyllum ruderale* (Asteraceae) y *Tournefortia hirsutissima* (Boraginaceae), respectivamente.

Porophyllum ruderale se conoce comúnmente como pápalo o papaloquelite, es una planta medicinal y comestible. De esta especie, se aislaron y purificaron tres compuestos derivados de tiofeno (**1–3**). La actividad antiproliferativa de estos compuestos se investigó sobre las líneas celulares de cáncer humano HepG2 y Hep3B (hepatocelular), A549 (pulmón) y HeLa (cérvix), y la línea celular IHH no cancerosa. Además, se investigó el efecto de los derivados de tiofeno (**1–3**) sobre la progresión del ciclo celular en las células Hep3B.

A partir de la planta medicinal, *Tournefortia hirsutissima*, conocida comúnmente como hierba rasposa, se llevó a cabo un estudio químico dirigido por la actividad antiinflamatoria, resultando en el aislamiento y purificación de tres alcoholes poliisoprenoides (**4–6**). Los compuestos **4–6** se evaluaron para su inhibición del NO en las células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Debido a que los compuestos **4–6** presentaron analogía estructural con dolicol fosfato, un poliisoprenoide con actividad apoptótica (Dohi *et al.* 1996), estos compuestos fueron investigados para su actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de cáncer humano HepG2, Hep3B, PC3 (próstata) y HeLa, y la línea celular IHH. Finalmente, se investigó el tipo de muerte celular inducida por el compuesto **4** sobre las células Hep3B.

2. ANTECEDENTES

2.1 Las plantas medicinales como fuente de compuestos bioactivos

Las plantas medicinales han servido a los humanos desde tiempos prehistóricos para tratar diversas dolencias (Nisar *et al.* 2018). Asimismo, las plantas medicinales son fuentes inestimables de compuestos bioactivos (Parsaeimehr *et al.* 2014). Por lo que, el estudio de las plantas medicinales en la búsqueda de compuestos con alguna actividad biológica bajo investigación ha resultado exitoso y ha generado amplio conocimiento a nivel de ciencia básica. Por ejemplo, el ácido ursólico, un triterpeno pentacíclico presente en varias especies de plantas tiene múltiples objetivos intracelulares y extracelulares en la apoptosis, metástasis, angiogénesis y procesos inflamatorios (Kashyap *et al.* 2016); el extracto de butanol de la corteza de *Canarium tramdenum* mostró capacidad antioxidante e inhibió la α -amilasa y la α -glucosidasa. Las amirinas α y β fueron los constituyentes más dominantes en este extracto. Estos triterpenos resaltaron los potenciales de las propiedades antiinflamatorias, antiulcerosas, antihiperlipidémicas, antitumorales y hepatoprotectoras de la corteza de *C. tramdenum* (Van Quan *et al.* 2019); la salvinatorina A de *Salvia divinorum* reduce los mediadores inflamatorios en macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) y muestra efectos antiinflamatorios moderados *in vivo* (Aviello *et al.* 2011). La especie *Salvia divinorum* se ha utilizado para uso recreativo y para el tratamiento de trastornos inflamatorios (como reumatismo) y dolor de cabeza. Este conocimiento, a nivel de ciencia básica es fundamental para el desarrollo de fármacos, donde los ingredientes activos son los compuestos naturales *per se* o sus derivados. Algunos ejemplos de fármacos desarrollados a partir de plantas y utilizados en la actualidad, son: Taxol®, es uno de los fármacos anticancerígenos más exitosos y ampliamente utilizados, su ingrediente activo es el paclitaxel, un compuesto diterpenoide tricíclico producido naturalmente en *Taxus brevifolia*, (Wani *et al.* 1971); Vinflunine y Oncovin® son otros dos agentes anticancerígenos y sus ingredientes activos son vinblastina y vincristina, respectivamente. Esos compuestos naturales son aislados de la especie *Catharanthus roseus* (Cragg & Pezzuto 2016).

2.2 Cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis». Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (OMS 2018). El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso en varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, que se enlistan a continuación.

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes.
- Carcinógenos químicos, como el amianto, los componentes del humo de tabaco, el alcohol, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminante del agua de bebida).
- Carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer.

La incidencia de esta enfermedad aumenta mucho con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo para determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad (OMS 2018).

El consumo de tabaco y de alcohol, la mala alimentación y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en el mundo, y lo son también de otras enfermedades no transmisibles (OMS. 2018).

Destaca casi la mitad de los casos de incidencia y más de la mitad de la mortalidad para Asia, en parte porque el 59.5% de la población mundial, allí reside. Europa representa el 23,4% de incidencia y el 20,3% de mortalidad, aunque representa solo el 9.8% de la población mundial, seguido por el 21% de incidencia y 14.4% de la mortalidad en el continente americano con el 13.3% de la población mundial (Bray *et al.* 2018). En ambos sexos, el cáncer de pulmón fue el responsable del mayor número de muertes por cáncer en todo el mundo con 1 761 007 (18.4%), seguido del cáncer de estómago 782 685 (8.2%), el cáncer de hígado 781 631 (8.2%), el cáncer de mama 626 679 (6.6%), el cáncer de esófago 508 585 (5.3%), el cáncer de colon 551 269 (5.8%), el cáncer de páncreas 432 242 (4.5%), el cáncer de próstata 358 989 (3.8%), el de cuello uterino 311 365 (3.3%), entre otros. (Bray *et al.* 2018).

2.3 Apoptosis

La apoptosis es un proceso programado de muerte celular, dependiente de energía que implica la activación de un grupo de proteasas de cisteína llamadas "caspasas" y una compleja cascada de eventos que vinculan los estímulos iniciadores con la desaparición final de la célula. La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones de células en los tejidos. La apoptosis también se presenta como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Elmore 2007).

2.3.1 Morfología de la apoptosis

Durante el proceso inicial de apoptosis, la contracción celular y la condensación de la cromatina nuclear son visibles por microscopía de luz. Con la contracción celular, las células son más pequeñas en tamaño, el citoplasma es denso y los orgánulos están más compactos. La condensación de la cromatina es el rasgo más característico de la apoptosis. Amplia formación de ampollas en la membrana plasmática se produce seguido por la fragmentación nuclear y la separación de fragmentos de células en cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos consisten en citoplasma con orgánulos estrechamente empaquetados con o sin un fragmento

nuclear. La integridad del orgánulo todavía se mantiene y se encuentra encerrado dentro de una membrana plasmática intacta. Esencialmente no hay una reacción inflamatoria asociada con el proceso de apoptosis porque las células apoptóticas no liberan sus componentes celulares en el tejido intersticial circundante, y son fagocitadas rápidamente por las células circundantes, por lo que es probable que prevengan una necrosis secundaria (Elmore 2007).

2.3.2 Apoptosis vs Necrosis

La necrosis es un proceso de muerte celular no controlado y considerado como tóxico. El proceso de necrosis se caracteriza por disolución de la cromatina e inflamación celular, mientras que la apoptosis conduce a la muerte celular con contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. La necrosis es un proceso pasivo e incontrolado que generalmente afecta a grandes campos de células, mientras que la apoptosis es controlada y depende de energía y puede afectar a individuos o grupos de células. En la necrosis hay pérdida de la integridad de la membrana celular dando como resultado la liberación del contenido citoplásmico en el tejido circundante, enviando señales quimiotácticas con el reclutamiento final de células inflamatorias. En la apoptosis no hay reacción inflamatoria debido a que las células apoptóticas no liberan sus componentes celulares en el tejido intersticial circundante y son fagocitadas rápidamente por macrófagos o células normales adyacentes. Dos factores que convertirán un proceso apoptótico en curso en un proceso necrótico incluyen la disminución en la disponibilidad de caspasas y ATP intracelular. Si una célula muere por necrosis o apoptosis, depende en parte de la naturaleza de la señal de muerte celular, el tipo de tejido, la etapa de desarrollo del tejido y el medio fisiológico. Utilizando histología convencional, no siempre es fácil distinguir la apoptosis de la necrosis, y pueden ocurrir simultáneamente dependiendo de factores como la intensidad y la duración del estímulo, el grado de agotamiento de ATP y la disponibilidad de caspasas (Elmore 2007).

2.3.3 Mecanismos de la apoptosis

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos y sofisticados, e involucran una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. Hasta la fecha, la investigación indica que existen dos vías apoptóticas principales: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (Elmore 2007; Wong 2011). Ambas vías eventualmente conducen a la fase de ejecución de la apoptosis. Una tercera vía menos conocida es la vía del retículo endoplásmico intrínseco (Wong 2011).

Comprender los mecanismos de la apoptosis puede ayudar en el desarrollo de fármacos dirigidos a ciertos genes o vías apoptóticas (Wong 2011). La irradiación o los fármacos utilizados para la quimioterapia contra el cáncer producen daños en el ADN de algunas células, lo que puede provocar la muerte por apoptosis a través de una vía dependiente de p53 (Elmore 2007).

Las caspasas son fundamentales para los mecanismos de la apoptosis, ya que son las iniciadoras y ejecutoras (Wong 2011). Las caspasas se expresan ampliamente en forma de proenzima inactiva en la mayoría de las células y, una vez activadas, a menudo pueden activar otras procaspasas, lo que permite el inicio de una cascada de proteasas. Algunas procaspasas también pueden autoactivarse. Esta cascada proteolítica, en la que una caspasa puede activar otras caspasas, amplifica la vía de señalización apoptótica y, por lo tanto, conduce a una muerte celular rápida. Las caspasas tienen actividad proteolítica y son capaces de escindir proteínas en los residuos de ácido aspártico, aunque las diferentes caspasas tienen diferentes especificidades que implican el reconocimiento de los aminoácidos vecinos. Una vez que las caspasas se activan inicialmente, parece haber un compromiso irreversible hacia la muerte celular. Se han identificado diez caspasas principales y se han categorizado ampliamente en iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10), efectoras o ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) y caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4 y -5) (Elmore 2007).

2.3.4 Vía extrínseca

La vía extrínseca o de receptores de muerte, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte. Aunque se han descrito varios receptores

de muerte, los receptores de muerte más conocidos son, el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos se denominan TNF y ligando de Fas (FasL), respectivamente. Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado con el receptor de TNF (TRADD) y el dominio de muerte asociado con Fas (FADD), así como proteasas de cisteína como la caspasa 8. La unión del ligando de muerte al receptor de muerte da como resultado la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de la proteína adaptadora del receptor-ligando se conoce como el complejo de señalización que induce la muerte. Este complejo inicia el ensamblaje y activación de procaspasa 8. La forma activada de esta enzima inicia la apoptosis mediante la escisión de otras caspasas ejecutoras (Wong 2011).

2.3.5 Vía intrínseca

Como su nombre lo indica, la vía intrínseca (Figura 2.2) se inicia dentro de la célula. Los estímulos internos, como el daño genético irreparable, la hipoxia, las concentraciones extremadamente altas de Ca^{2+} citosólico y el estrés oxidativo grave son algunos factores desencadenantes del inicio de la vía mitocondrial intrínseca. Independientemente de los estímulos, esta vía es el resultado del aumento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo C en el citoplasma. Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, que lleva el nombre del gen BCL2 (Wong 2011). Las proteínas de la familia Bcl-2 se encuentran en la encrucijada de la apoptosis porque están involucradas en la integridad de la membrana mitocondrial. La interrupción de la integridad de la membrana mitocondrial es esencial para iniciar eventos que conducen a la inducción de la apoptosis (O'Brien & Borthakur 2012). Existen dos grupos principales de las proteínas Bcl-2, las proteínas proapoptóticas (por ejemplo, Bax, Bak, Bad, Bcl-X, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) (Wong 2011). El equilibrio entre las proteínas pro- y antiapoptóticas determina si se iniciará la apoptosis (Wong 2011). Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 mantienen la integridad de la membrana mitocondrial y, por lo tanto, evitan la inducción de la

apoptosis a través de la vía mitocondrial, mientras que las actividades coordinadas de los miembros proapoptóticos lideran a la formación de poros en la membrana mitocondrial (O'Brien & Borthakur 2012). Bid y Bim activados activan Bax y Bak. La oligomerización de Bax y Bak activados forma los poros en la membrana mitocondrial que conducen a la liberación del citocromo C (O'Brien & Borthakur 2012). El citocromo C se une a Apaf-1, y el complejo Apaf-1/citocromo C se une a procaspasa-9 para formar el complejo conocido como apoptosoma. El apoptosoma provoca la autoactivación de la caspasa 9. La caspasa-9 a su vez activa las caspasas-3, -6 y -7 (O'Brien & Borthakur 2012; Wong 2011). Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 previenen la oligomerización de Bax/Bak y la formación de poros en la membrana mitocondrial (O'Brien & Borthakur 2012). Por otro lado, Smac/DIABLO u Omi/HtrA2 promueven la activación de la caspasa al unirse a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), lo que posteriormente conduce a una interrupción en la interacción de las IAPs con la caspasas-3 o -9 (Wong 2011).

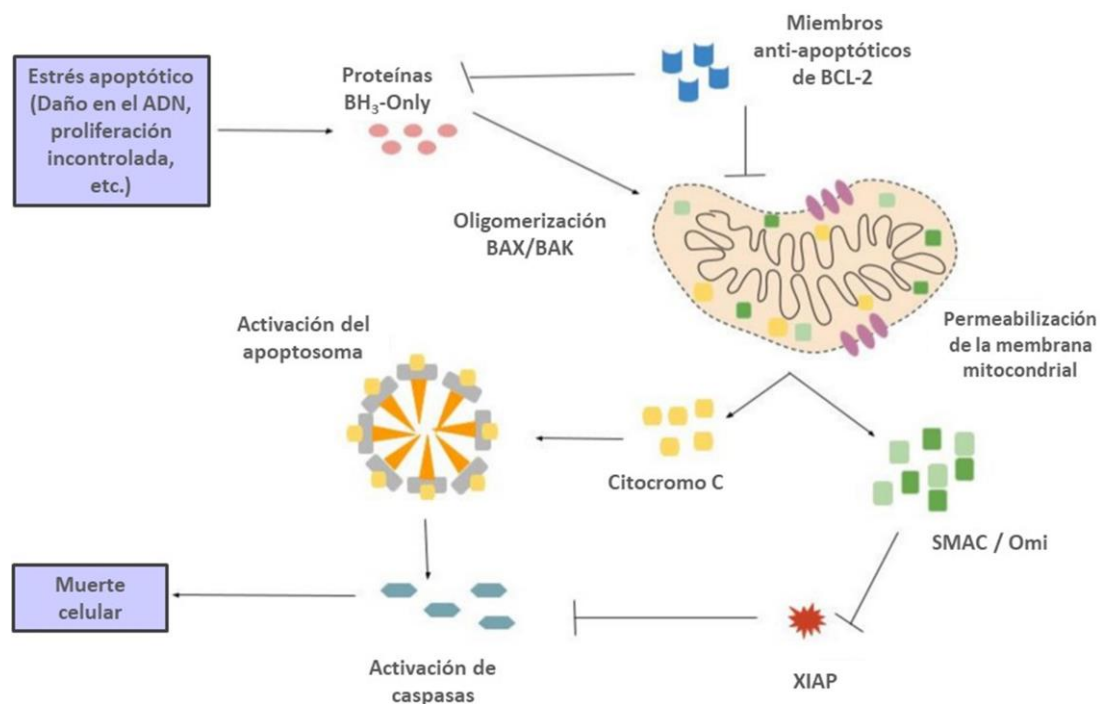


Figura 2.2. Vía intrínseca de la apoptosis. Las flechas representan la activación y las barras T representan la inhibición. Esta ilustración fue tomada de Claire M. Pfeffer and Amareshwar T. K. Singh, 2017 y adaptada para esta tesis.

2.3.6 Desregulación de la apoptosis

Se cree que la supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis desempeña un papel central en el desarrollo y la progresión de algunos tipos de cáncer. Existe una variedad de mecanismos moleculares que las células tumorales utilizan para suprimir la apoptosis. Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis por la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o por la regulación negativa o mutación de proteínas proapoptóticas como Bax (Elmore 2007). La expresión de Bcl-2 y Bax está regulada por el gen supresor de tumores p53. Ciertas formas de linfoma de células B humanas tienen una sobre expresión de Bcl-2, y ésta es una de las primeras y más sólidas líneas de evidencia de que el fracaso de la muerte celular contribuye al cáncer. Ciertas células inmunitarias (células T y células asesinas naturales) normalmente destruyen las células tumorales a través de la vía del receptor de la muerte. Con el fin de evadir la destrucción inmune, algunas células tumorales disminuirán la respuesta de la vía del receptor de la muerte al FasL producido por las células T. Se ha demostrado que esto ocurre en una variedad de formas, incluida la regulación negativa del receptor Fas en las células tumorales. Otros mecanismos incluyen la expresión del receptor Fas no funcional (Elmore 2007).

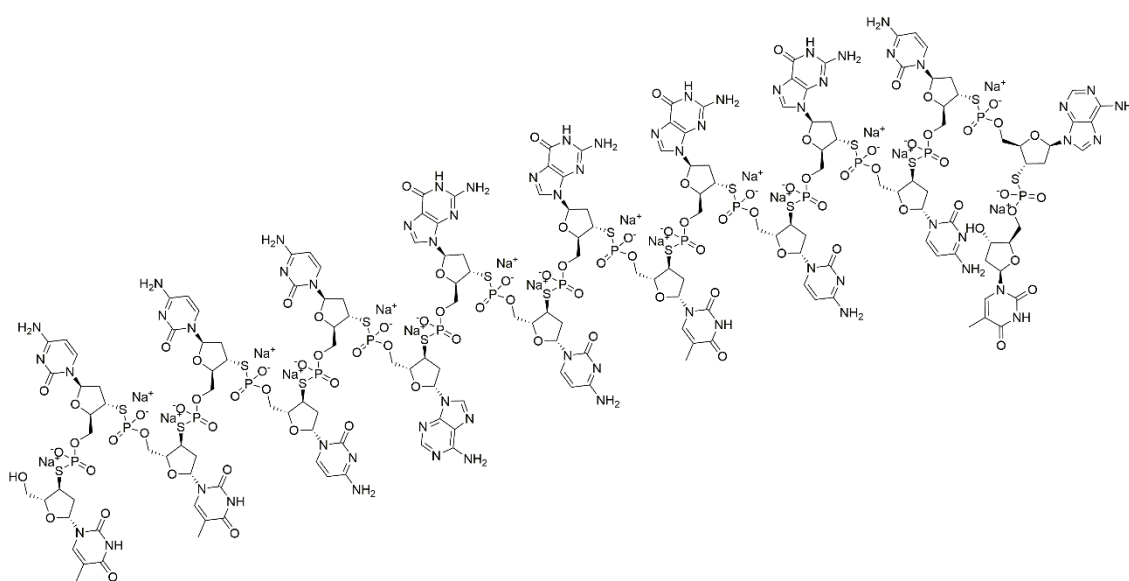
Las alteraciones de varias vías de señalización celular pueden dar como resultado la desregulación de la apoptosis y provocar cáncer. El gen supresor de tumores p53 es un factor de transcripción que regula el ciclo celular y es el gen más mutado en la tumorigénesis humana. El papel crítico de p53 es evidente por el hecho de que está mutado en más del 50% de todos los tipos de cáncer humanos. El gen p53 puede activar proteínas reparadoras de ADN cuando el ADN ha sufrido daños, puede mantener el ciclo celular en el punto de regulación G₁/S en el reconocimiento de daños en el ADN, y puede iniciar la apoptosis si el daño en el ADN demuestra ser irreparable. La tumorigénesis puede ocurrir si este sistema sale mal. Si el gen p53 está dañado, la supresión del tumor se reduce severamente. El gen p53 puede ser dañado por la radiación, varios productos químicos y virus como el virus del papiloma humano (VPH) (Elmore 2007).

2.4 Estrategias para el tratamiento del cáncer dirigidas a la apoptosis

Un defecto o anomalía en las vías apoptóticas también puede ser un objetivo interesante del tratamiento del cáncer. Los fármacos o las estrategias de tratamiento que pueden restaurar las vías de señalización apoptótica hacia la normalidad tienen el potencial de eliminar las células cancerosas, que dependen de estos defectos para mantenerse con vida. Muchos descubrimientos recientes e importantes han abierto nuevas puertas a posibles nuevas clases de medicamentos contra el cáncer (Wong 2011). A continuación, se presentan algunas estrategias en el tratamiento contra el cáncer.

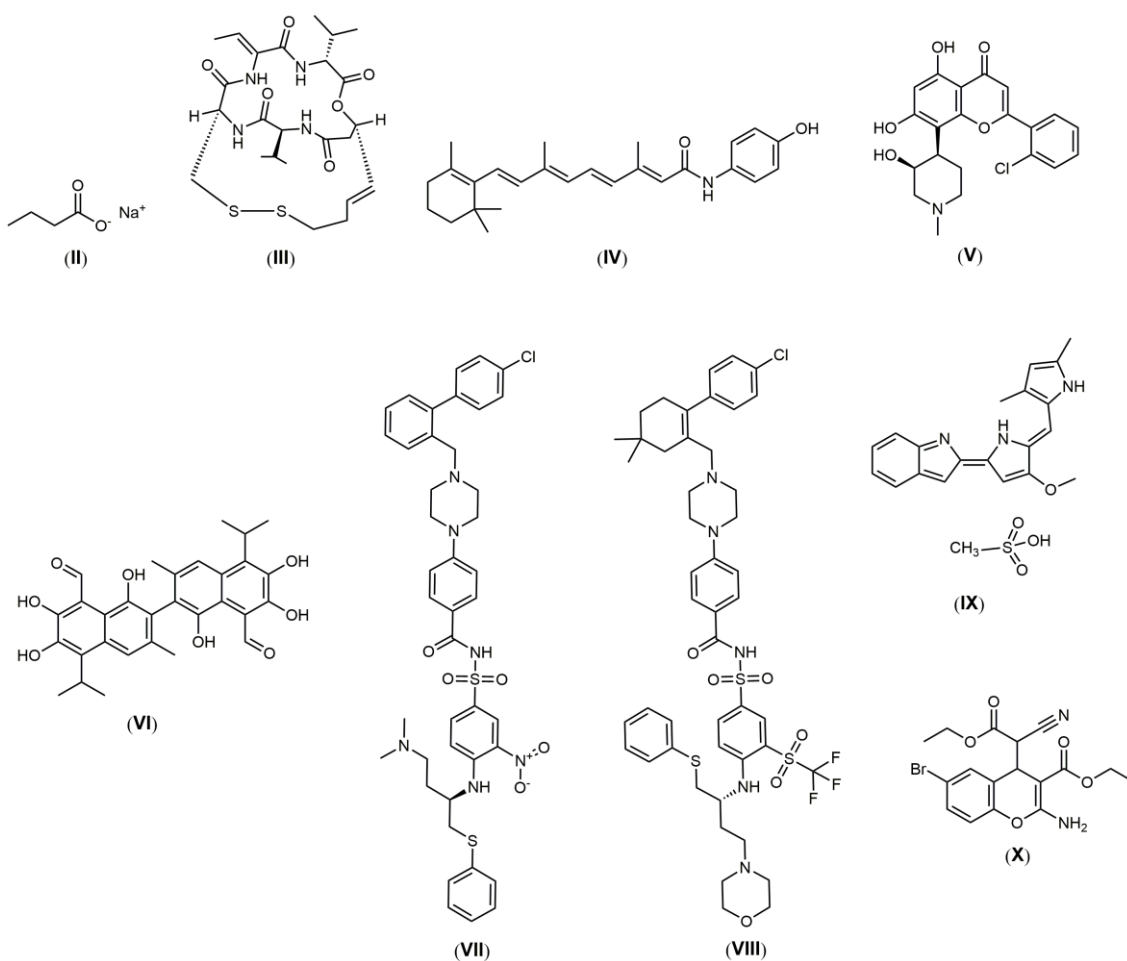
2.4.1 Estrategias dirigidas a la familia de proteínas Bcl-2

Un buen ejemplo de estos agentes es el fármaco oblimersen sódico (I) el primer agente dirigido a Bcl-2 que ingresa en un ensayo clínico (Wong 2011). Oblimersen sódico es un oligonucleótido fosforotioato de 18 bases complementario (antisentido) de los primeros seis codones del ARNm de Bcl-2, lo que conduce a una disminución selectiva en las concentraciones del ARNm de Bcl-2 y los niveles de la proteína (O'Brien & Borthakur 2012). Se ha informado que el fármaco muestra efectos quimiosensibilizantes en el tratamiento combinado con fármacos convencionales contra el cáncer en pacientes con leucemia mieloide crónica y una mejora en la supervivencia en estos pacientes.



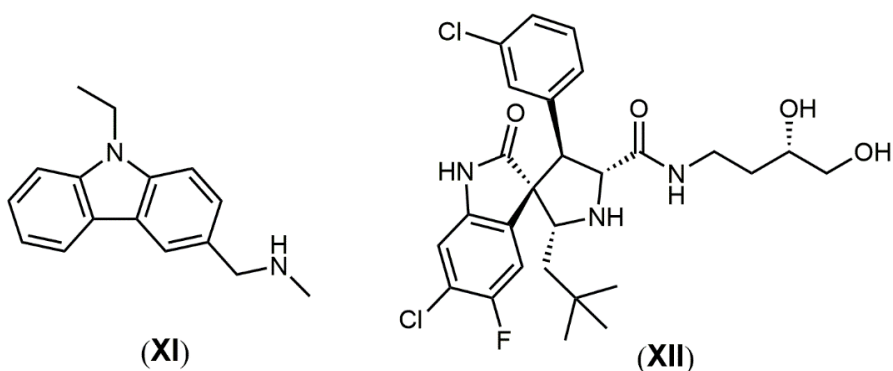
(I)

Otros ejemplos incluidos en esta categoría son moléculas pequeñas inhibitoras de la familia de proteínas Bcl-2. Estas se pueden dividir en: 1) aquellas moléculas que afectan la expresión de genes o proteínas y 2) aquellas que actúan sobre las mismas proteínas. Los ejemplos para el primer grupo incluyen butirato de sodio (II), depsipétida (III), fenretinida (IV) y flavopirodol (V), mientras que el segundo grupo incluye gosipol (VI), ABT-737 (VII), ABT-263 (VIII), GX15-070 (IX) y HA14-1 (X) (Wong 2011). Algunas de estas pequeñas moléculas pertenecen a otra clase de medicamentos llamados miméticos BH3, llamados así porque imitan la unión de las proteínas solo BH3 al surco hidrófobo de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Un ejemplo clásico de un mimético de BH3 es ABT-737, que inhibe las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-W (Wong 2011).



2.4.2 Terapia de fármacos dirigida a p53

Existen moléculas pequeñas que pueden restaurar p53 mutante a sus funciones de tipo silvestre. Por ejemplo, Phikan083 (XI), una molécula pequeña y derivada del carbazol, se ha demostrado que se une y restaura al gen p53 mutante. Otros medicamentos que se dirigen a p53 incluyen las nutlinas, MI-219 (XII) y las tenovinas. Las nutlinas son análogos de *cis*-imidazolina, que inhiben la interacción MSM2-p53, estabilizan p53 e inducen selectivamente la senescencia en células cancerosas. MI-219 interrumpe la interacción MDM2-p53, lo que resulta en la inhibición de la proliferación celular, la apoptosis selectiva en células tumorales y la inhibición completa del crecimiento tumoral. Las tenovinas, por otro lado, son moléculas pequeñas activadoras de p53, que se ha demostrado disminuyen el crecimiento del tumor *in vivo* (Wong 2011).



2.4.3 Terapia de fármacos basada en las caspasas

La apoptina es un agente inductor de caspasas que se derivó inicialmente del virus de la anemia de pollo y tenía la capacidad de inducir selectivamente la apoptosis en células malignas, pero no en normales (Wong 2011). Otra clase de medicamentos que son activadores de caspasas son las moléculas pequeñas activadoras de caspasas. Estos son péptidos que contienen el motivo arginina-glicina-aspartato. Son proapoptóticos y tienen la capacidad de inducir la autoactivación directa de procaspasa 3. También se ha demostrado que reducen el umbral de activación de las caspasas, lo que contribuye a un aumento de la sensibilidad a los medicamentos de las células cancerosas (Wong 2011).

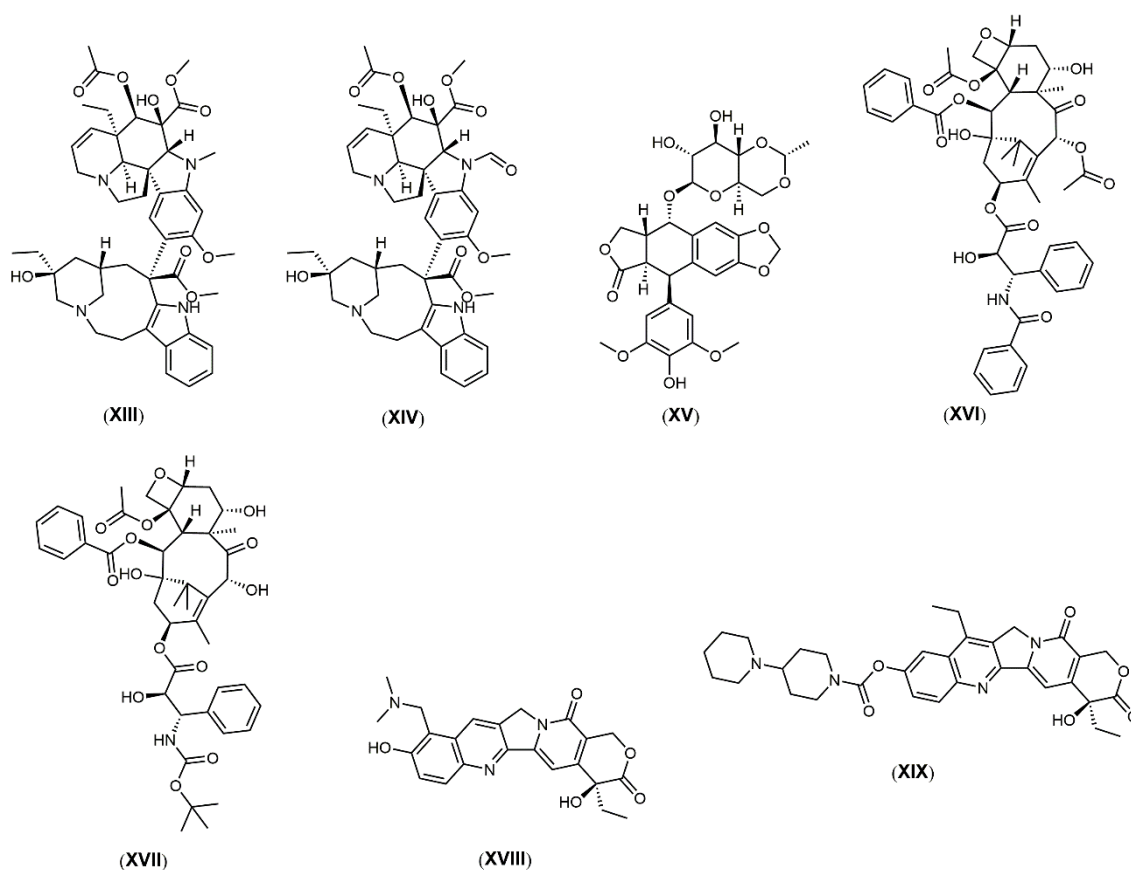
2.4.4 Productos naturales en la quimioterapia del cáncer

Más del 60% de los medicamentos actuales contra el cáncer se derivaron a partir de fuentes naturales (Cragg & Pezzuto 2016). La naturaleza continúa siendo una fuente abundante de compuestos químicos diversos y biológicamente activos, y si bien relativamente pocos de los productos naturales aislados se convierten en fármacos clínicamente eficaces por sí mismos, estas moléculas únicas a menudo sirven como modelos para la preparación de análogos más eficaces y profármacos mediante la aplicación de metodologías químicas, como la síntesis total o combinatoria (paralela), o la manipulación de vías biosintéticas (Cragg & Pezzuto 2016).

Los agentes derivados de plantas disponibles en la actualidad, como vinblastina (VBL; **XIII**) y vincristina (VCR; **XIV**), etopósido (**XV**), paclitaxel (**XVI**) (Taxol®), docetaxel (**XVII**), topotecan (**XVIII**) e irinotecan (**XIX**), están entre los quimioterapéuticos más eficaces contra el cáncer (Cragg & Pezzuto 2016). VBL y VCR fueron los primeros agentes derivados de plantas que avanzaron en el uso clínico. El mecanismo de acción de estos alcaloides de la vinca es interrumpir los microtúbulos, causando el arresto de las células en la metafase y conduciendo a la muerte celular apoptótica. El paclitaxel y otros taxanos promueven la polimerización de los heterodímeros de tubulina a microtúbulos, suprimiendo los cambios dinámicos en los microtúbulos que dan como resultado el arresto mitótico. Paclitaxel se usa en el tratamiento del cáncer de mama y ovario, y también ha demostrado eficacia contra el sarcoma de Kaposi, mientras que docetaxel se usa principalmente en el tratamiento del cáncer de mama (Cragg & Pezzuto 2016). Los derivados semisintéticos de las camptotecinas (topotecan e irinotecan) inhiben el complejo binario topoisomerasa I-ADN que resulta en un complejo ternario estable, previniendo así la religación del ADN y causando daño al ADN, lo que resulta en la apoptosis. El etopósido inhibe la topoisomerasa II, lo que induce la escisión del ADN mediada por la topoisomerasa II. El etopósido se usa para linfomas y cánceres bronquiales y testiculares (Cragg & Pezzuto 2016).

Sin embargo, muchos de los agentes derivados de las plantas presentan una mala solubilidad en medios acuosos y efectos secundarios tóxicos significativos. Por lo tanto, hay una continua investigación en la síntesis de análogos de estas

moléculas para aumentar la solubilidad acuosa y en la orientación de las moléculas al tumor en específico (Cragg & Pezzuto 2016). Además, se están descubriendo nuevos compuestos líderes a partir de fuentes naturales, que proporcionan nuevas vías para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos novedosos y eficaces (Cragg & Pezzuto 2016).



2.5 Inflamación

La inflamación es un fenómeno generalizado que opera durante las perturbaciones graves de la homeostasis, tales como infección, lesión y exposición a contaminantes, y se desencadena por receptores inmunes innatos que reconocen a los patógenos y las células dañadas (Ashley *et al.* 2012). Las funciones principales de la inflamación son rápidamente destruir o aislar la fuente subyacente de la perturbación, eliminar el tejido dañado, y luego restaurar la homeostasis tisular. En general, se cree que una respuesta inflamatoria controlada es beneficiosa (por ejemplo, para proporcionar protección contra la infección), pero puede llegar a ser

perjudicial si se desregula, por ejemplo, causando choque séptico (Medzhitov 2008), trastornos autoinmunes o autoinflamatorios, enfermedad neurodegenerativa (Dinarello 2010) o cáncer (Dinarello 2010; Lu *et al.* 2006).

2.5.1 Mecanismos de la inflamación

La respuesta inflamatoria está coordinada por una amplia gama de mediadores que forman redes reguladoras complejas. El primer paso de la cascada inflamatoria implica el reconocimiento de la infección o daño. Esto se logra típicamente mediante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs son un conjunto limitado y definido de patrones moleculares conservados que son llevados por todos los microorganismos de una clase dada (ya sea patógena o comensal). Los PAMPs se definen en el sentido de que el huésped ha desarrollado un conjunto correspondiente de receptores (conocidos como receptores de reconocimiento de patrones) que detectan su presencia (Medzhitov 2008). Las alarminas, o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), son moléculas endógenas que señalan daño o necrosis y también son reconocidas por el sistema inmune innato (Ashley *et al.* 2012).

Las señales de daño son reconocidas por receptores del sistema inmune innato, tal como los receptores tipo Toll (TLRs) y receptores tipo NOD (NLRs) (Medzhitov 2008; Ashley *et al.* 2012). Una vez que se produce el reconocimiento del ligando, los TLRs activan vías de señalización comunes que culminan en la activación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B), conduciendo a la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como interleucina-1-beta (IL-1 β), IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otras. En combinación con quimiocinas atrayentes y diversas moléculas coestimuladoras, estas proteínas solubles facilitan el reclutamiento de células efectoras, como monocitos y neutrófilos, al sitio de perturbación. Los neutrófilos crean un ambiente citotóxico al liberar químicos nocivos de gránulos citoplasmáticos (un proceso llamado desgranulación). La liberación rápida de estos químicos requiere el consumo de glucosa y oxígeno, fenómeno conocido como explosión respiratoria. Los químicos tóxicos liberados incluyen especies altamente reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), y varias proteinasas. Estas sustancias son destructivas tanto para los patógenos como para los huéspedes y esencialmente

inducen la licuefacción del tejido circundante para evitar las metástasis microbianas. Estos mecanismos efectores son los principales contribuyentes al daño colateral del huésped (Ashley *et al.* 2012). El efecto neto de este proceso culmina en los signos cardinales estereotipados de inflamación local: calor, hinchazón, enrojecimiento, dolor y pérdida de la función (Ashley *et al.* 2012).

La última fase de la inflamación es su resolución, que es crítica para limitar el daño colateral al huésped. Después de las primeras horas de la inflamación, un programa coordinado de resolución es puesto en movimiento por macrófagos residentes de tejido y los reclutados. Durante la inflamación aguda, estas células producen leucotrienos y prostaglandinas proinflamatorias, pero más adelante cambian lipoxinas, que bloquean el reclutamiento de neutrófilos y en su lugar favorecen mayor infiltración de monocitos importantes para la cicatrización de heridas (Ashley *et al.* 2012).

2.6 Inflamación y cáncer

Cada vez existen más pruebas que apoyan la asociación entre la inflamación crónica y el desarrollo del cáncer (Lu *et al.* 2006). Por ejemplo, en el tracto gastrointestinal, la infección gástrica por *Helicobacter pylori* es la causa principal de adenocarcinoma y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa. En el tracto biliar, colangiocarcinoma fue seguido por el infiltrado inflamatorio crónico inducido por la infección de *Clonorchis sinensis*. Dentro del sistema hepático, la hepatitis crónica causada por los virus de la hepatitis B y C predispone al carcinoma hepatocelular. Además, la infección por el virus del papiloma humano es la causa principal de cáncer de pene y anogenital. Esquistosomiasis y virus del herpes humano tipo 8 pueden aumentar el riesgo de cáncer de vejiga y sarcoma de Kaposi, respectivamente (Lu *et al.* 2006).

La inflamación crónica no causada por una infección también puede contribuir a la carcinogénesis. Por ejemplo, el riesgo de cáncer de esófago puede aumentar por la enfermedad inflamatoria esofagitis. También se encontraron posibles asociaciones entre el asbesto y el mesotelioma, sílice y humo de cigarrillo con cáncer bronquial, asma crónica y cáncer de pulmón, sarcoidosis y cáncer de pulmón, piel y de hígado, liquen plano ulceroso y carcinoma verrugoso, inflamación del prepucio/fimosis y

cáncer de pene, y enfermedad inflamatoria pélvica o inflamación epitelial ovárica y cáncer de ovario. La prostatitis crónica, resultante de una infección bacteriana persistente o de estímulos no infecciosos, se asoció con el cáncer de próstata (Lu *et al.* 2006).

La angiogénesis, un proceso crítico en la progresión tumoral, se asocia con inflamación crónica, como la psoriasis, la artritis reumatoide y la fibrosis (Lu *et al.* 2006).

2.6.1 Los mecanismos para la asociación entre la inflamación y el cáncer

El microambiente de la inflamación crónica es predominante por los macrófagos. Estos macrófagos, junto con otros leucocitos, generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno para combatir la infección. Sin embargo, en un entorno de daño tisular continuo y la proliferación celular, la persistencia de estos agentes que combaten la infección es perjudicial. Pueden producir agentes mutagénicos, como el peroxinitrito, que reacciona con el ADN (Lu *et al.* 2006).

Las mutaciones acumuladas en las células epiteliales conducen a una desregulación de su crecimiento y migración. Estas células epiteliales desreguladas también pueden indicar el reclutamiento de leucocitos. Además, las células tumorales también pueden producir citocinas y quimiocinas para atraer células inmunes y facilitar el desarrollo del cáncer (Lu *et al.* 2006).

En estudios clínicos, se descubrió que el aumento de la densidad de macrófagos asociados a tumores se asocia con un mal pronóstico. Los macrófagos asociados a tumores contribuyen al desarrollo del tumor a través de varios mecanismos. Los macrófagos asociados a tumores liberan IL-10 y prostaglandina E2, que suprimen la respuesta antitumoral. Los macrófagos asociados a tumores también pueden facilitar el crecimiento del tumor mediante la liberación de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), endotelina-2 y activador del plasminógeno de tipo uroquinasa. Los macrófagos asociados a tumores pueden producir IL-1, que regula la transcripción de VEGF. Los macrófagos asociados a tumores también pueden facilitar la invasión y metástasis de las células tumorales. Además, los macrófagos asociados a tumores pueden inducir el TNF- α y la iNOS, cuya función vincula la inflamación con el cáncer. Además, los macrófagos

asociados a tumores liberan el factor de crecimiento epidérmico y otros ligandos de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico para promover la proliferación y migración de células tumorales. Los neutrófilos asociados a tumores mejoran la angiogénesis, invasión y metástasis tumorales de manera similar a los macrófagos y mastocitos asociados a tumores (Lu *et al.* 2006).

2.6.2 El papel del óxido nítrico en la inflamación y el cáncer

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso e inorgánico, cuya función predominante es la de un mensajero y una molécula efectora. La síntesis de NO es catalizada por una de las tres isoformas de sintasa de óxido nítrico (NOS): NOS1 (neuronal o nNOS), NOS2 (endotelial o eNOS) y NOS3 (inducible o iNOS) (Lechner *et al.* 2005). En las circunstancias de inflamación crónica, la generación continua de NO puede provocar daños en el ADN, la interrupción de la reparación del ADN y la modificación postraduccional propensa al cáncer. Se encontró que la iNOS, se sobre expresa en enfermedades inflamatorias crónicas y varios tipos de cáncer. La iNOS se somete a la inducción por citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , y a la transactivación por NF- κ B. El bloqueo de la activación de NF- κ B inducida por lipopolisacárido (LPS) conduce a la inhibición de la expresión de la iNOS y la generación de NO y la inhibición de la inflamación. Una vez que se forman los tumores asociados con la inflamación, la expresión de iNOS puede ser estimulada de manera persistente por las citocinas y NF- κ B que prevalecen dentro del microambiente inflamatorio del tumor. El NO también puede regular la angiogénesis, la adhesión e infiltración de leucocitos y la metástasis. Además, se encontró en un estudio en un modelo animal que un inhibidor selectivo de la iNOS previene la progresión de la tumorigénesis esofágica de rata, que es inducida por el carcinógeno *N*-nitrosometilbencilamina. Cabe destacar que los estudios que utilizan una amplia gama de modelos *in vitro* e *in vivo* muestran que la señalización de iNOS/NO también puede inducir COX-2, que por sí misma es un vínculo prometedor entre la inflamación y el cáncer (Lu *et al.* 2006).

2.7 Características de las líneas celulares utilizadas en el presente estudio

HepG2 (ATCC® HB-8065™). Son células humanas de tejido de hígado, adherentes en cultivo (Figura 2.3). HepG2 se derivó de un carcinoma hepatocelular hepático de un varón caucásico de 15 años. No hay evidencia de un genoma del virus de la hepatitis B en esta línea celular (ATCC 2019).

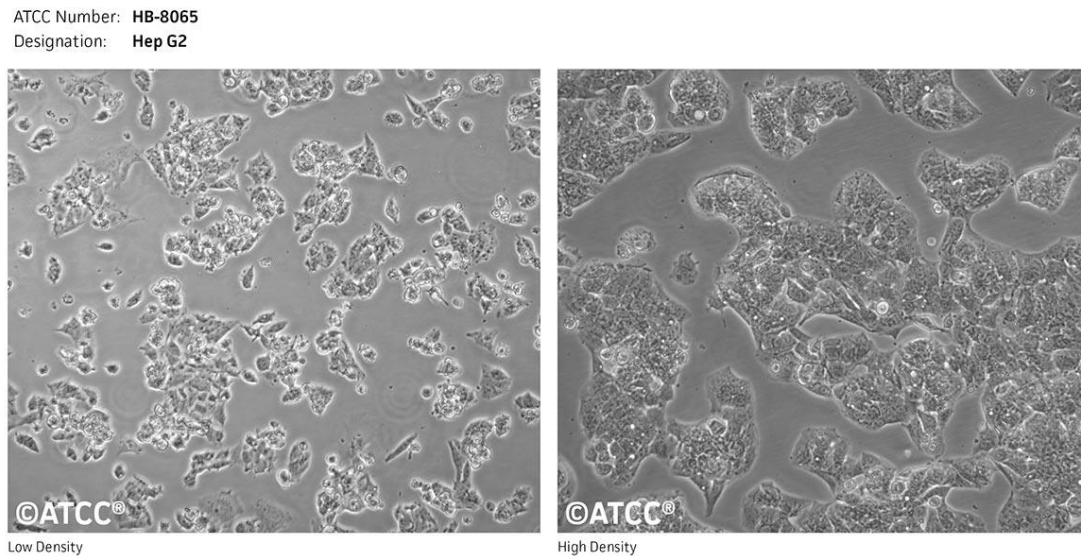


Figura 2.3. Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular HepG2, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/HB-8065.aspx#characteristics>.

Hep3B (ATCC® HB-8064™). Son células humanas de tejido de hígado, adherentes en cultivo. Esta línea de carcinoma hepatocelular contiene un genoma integrado del virus de la hepatitis B (ATCC 2019).

A549 (ATCC® CCL-185™). Son células humanas de tejido de pulmón, adherentes en cultivo (Figura 2.4). Esta línea de carcinoma fue iniciada en 1972 mediante un cultivo de tejido carcinomatoso pulmonar de un varón caucásico de 58 años. Tiempo de duplicación de la población: aproximadamente 22 h (ATCC 2019).

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**

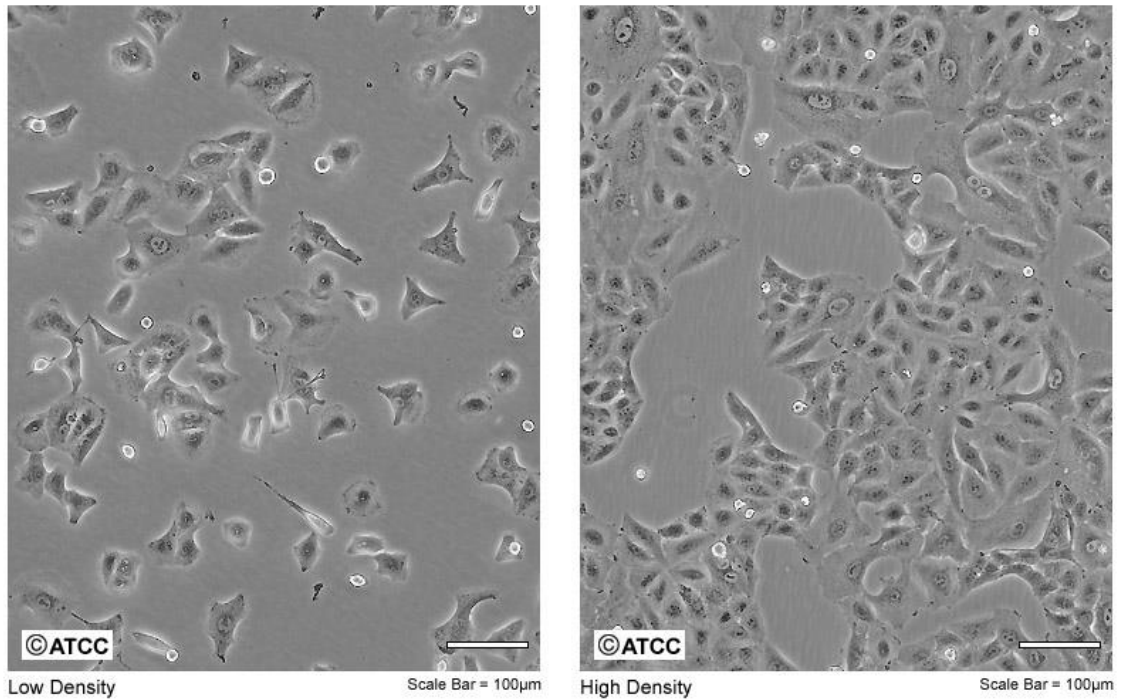


Figura 2.4. Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular A549, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#characteristics>.

HeLa (ATCC® CCL-2™). Son células humanas de tejido de cérvix (cuello uterino), adherentes en cultivo (Figura 2.5). Estas células de adenocarcinoma contienen el virus del papiloma humano (ATCC 2019).

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**

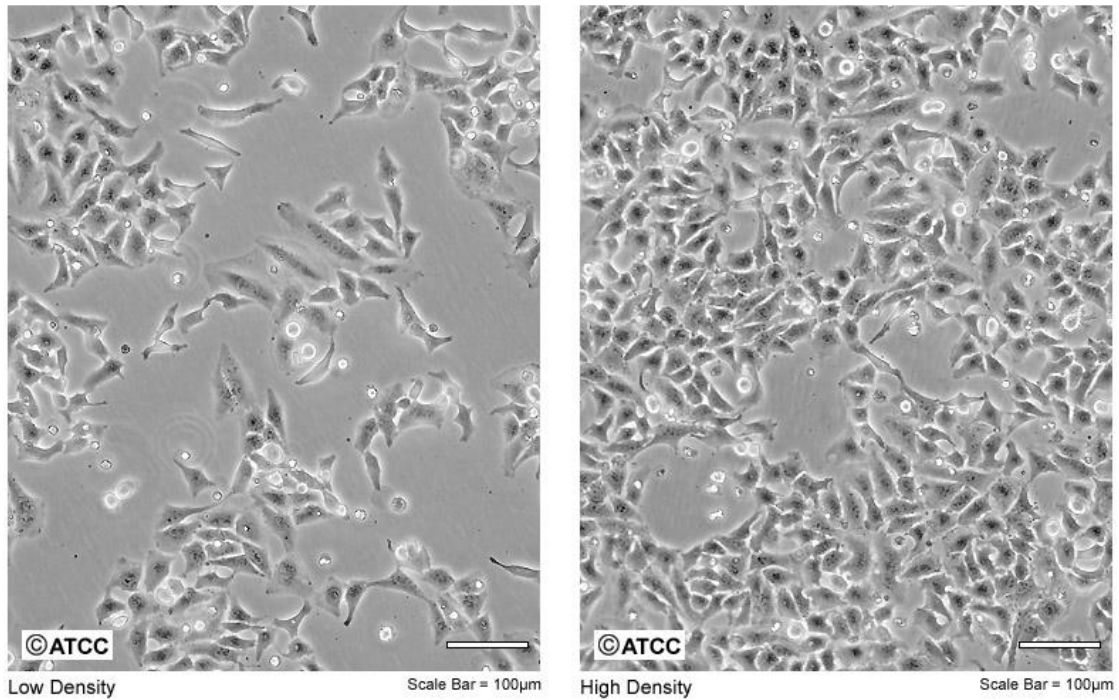


Figura 2.5. Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular HeLa, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#characteristics>.

PC-3 (ATCC® CRL-1435™). Son células humanas de tejido de próstata; derivado del sitio metastásico: hueso, adherentes en cultivo (Figura 2.6). La línea PC-3 se inició a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de grado IV de un varón caucásico de 62 años (ATCC 2019).

ATCC Number: **CRL-1435**™
Designation: **PC-3**

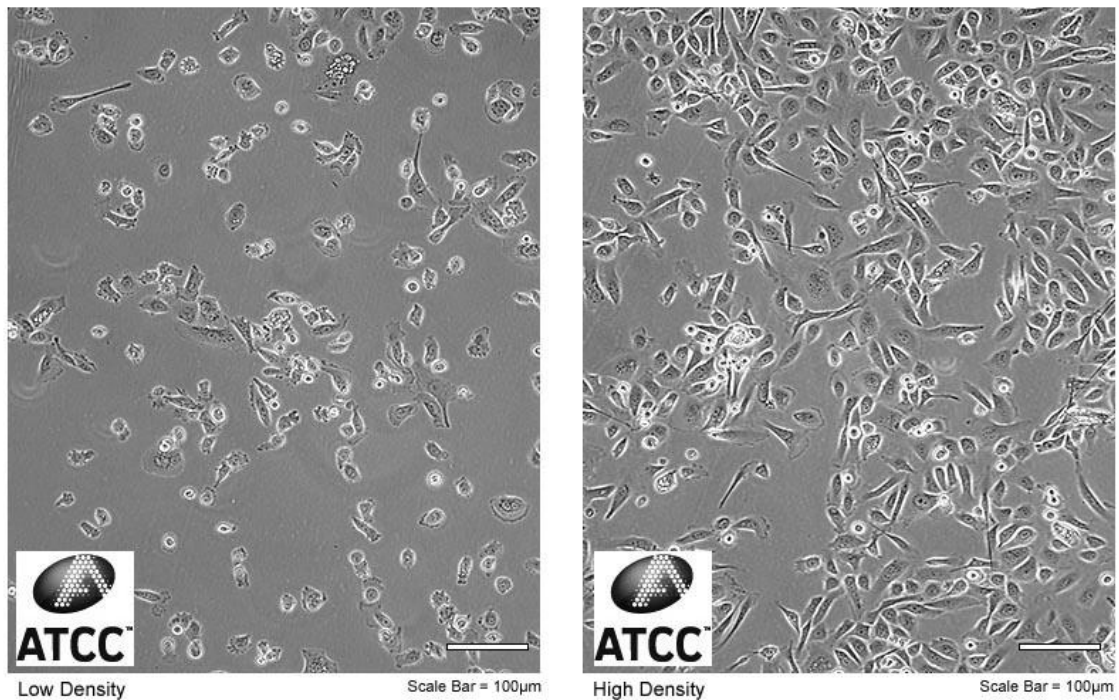


Figura 2.6. Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular PC3, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx#characteristics>.

IHH. Esta línea celular corresponde a hepatocitos humanos inmortalizados y fue generada mediante la transfección de un ADN plasmídico que expresa la región genómica del genotipo del VHC en hepatocitos humanos primarios (Basu *et al.* 2006).

RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™). Esta línea celular tipo macrófago (Figura 2.7) es de un organismo de ratón (*Mus musculus*) y se estableció en 1978 a partir de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson. Esta línea celular es fácil de propagar, adherente en cultivo (ATCC 2019).

ATCC Number: **TIB-71™**
Designation: **RAW 264.7**

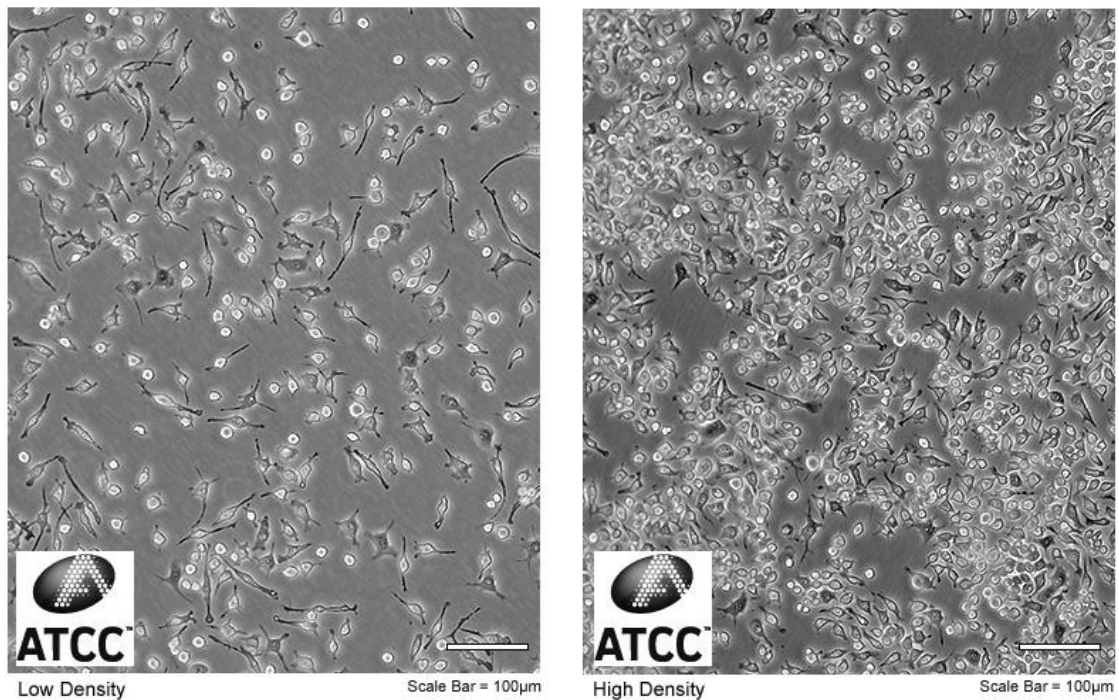


Figura 2.7. Micrografías de cultivos celulares (alta y baja confluencia) de la línea celular RAW 264.7, tomadas de <https://www.atcc.org/products/all/TIB-71.aspx#culturemethod>.

2.8 Información de las especies vegetales en estudio

2.8.1 Generalidades de *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum*

La especie *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* (Asteraceae) (Figura 2.8), en México se conoce comúnmente como pápalo o papaloquelite. *Porophyllum ruderale* se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos de Norteamérica, México (Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas), Centroamérica y hasta el norte de Sudamérica (Maldonado-Almanza 1997; Villareal & Villaseñor 2004; Lara *et al.* 2011). Esta

especie es comestible de la cual se consumen sus hojas frescas y es uno de los quelites más representativos de México (Maldonado-Almanza 1997; Mazari & Boettler 2015). El pápalo (*Porophyllum ruderale*) es la novena especie de quelite más consumida por diversos grupos étnicos. Además, se cultiva en los estados de Guerrero, Morelos, Puebla y Oaxaca (Lara *et al.* 2011; Mazari & Boettler 2015). Considerando el costo y contenido nutricional del papaloquelite, la contribución nutritiva en la alimentación humana de esta especie es muy significativa, además, contribuye a dar variedad a la dieta aportando texturas, sabores y aroma que enriquecen la cocina mexicana (Lara *et al.* 2011).

Esta especie también se utiliza en la medicina popular, para la curación de heridas, como antiinflamatorio, antimicrobiano y para el tratamiento de contusiones y traumas (Raggi *et al.* 2015); para tratar la sarna, en aplicaciones locales (Lara *et al.* 2011).



Figura 2.8. Imagen de la especie *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum*, tomada de: Diagnóstico del pápaloquelite en México, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. var. *macrocephalum* (DC.) Cronq. (Lara *et al.* 2011).

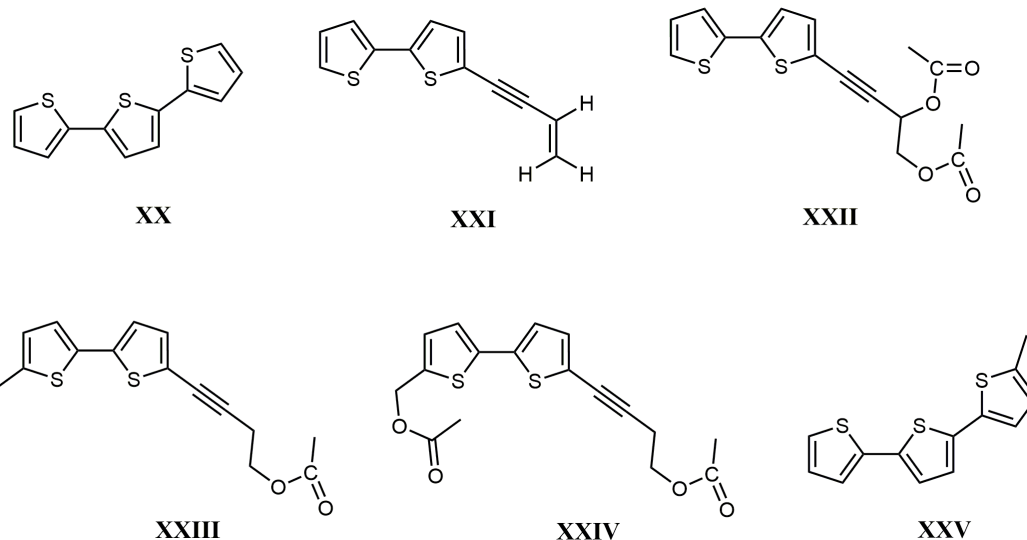
2.8.2 Antecedentes químicos y farmacológicos de *P. ruderale*

Los componentes químicos más estudiados para esta especie corresponden a los contenidos dentro de su aceite esencial: los componentes principales dentro del aceite corresponden a monoterpenos (limoneno, sabineno, 4-terpineol, *trans*- β -ocimeno, β -mirceno, isocomeno, 2-ol-davanona y, α y β -pineno) y derivados de ácidos grasos ((*E,E*)-dodecadial, heptadecanal, 1-undeceno) (Andrade-Neto *et al.* 1994; Guillet *et al.* 1998; Loayza *et al.* 1999; Souza *et al.* 2003; Raggi *et al.* 2015).

En un modelo de pleuresía en ratón inducida por lipopolisacárido (LPS), el aceite de *Porophyllum ruderale*, cuando se administró por vía oral, fue capaz de inhibir la inflamación incluyendo la migración celular; un efecto similar se observó para limoneno puro. Limoneno y β -mirceno puros fueron eficaces en la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) a dosis inferiores a la citotoxicidad de estos monoterpenos. Además, limoneno y β -mirceno inhibieron significativamente la producción de γ -interferón e IL-4 (Souza *et al.* 2003).

Asimismo, a partir de esta especie se han aislado y caracterizado los compuestos derivados de tiofeno: 2,2':5',2''-tertiofeno (**XX**), 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**XXI**), 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**XXII**), 5-(4''acetoxi-1''-butinil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno (**XXIII**), 5-(4''acetoxi-1''-butinil)-5'-metilacetoxi-2,2'-bitiofeno (**XXIV**) y 5-metil-2,2':5',2''-tertiofeno (**XXV**), de las raíces se aislaron **XX-XXII** (Bohlmann & Zdero 1979), y de las partes aéreas se aislaron **XX, XXI, XIII, XIV** y **XV** (Bohlmann *et al.* 1980; Takahashi *et al.* 2011).

Los compuestos **XX-XXII** también fueron aislados a partir de *Echinops grijissi* Hance junto con otros cinco derivados de tiofeno (Jin *et al.* 2008). Jin y colaboradores, evaluaron los ocho compuestos para su citotoxicidad en cuatro líneas celulares de cáncer humano (HL-60, K562, MCF-7 y HepG2). Los compuestos se consideraron activos cuando presentaron una $CI_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ (Jin *et al.* 2008). En referencia a los compuestos **XX-XXII**, el compuesto **XX** presentó actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer K562, MCF-7 y HepG2, mientras que el compuesto **XXI** fue activo contra HL-60 y K562 y, finalmente el compuesto **XXII** resultó activo contra K562, HL-60 y HepG2 (Jin *et al.* 2008).



En otro estudio (Takahashi *et al.* 2011), se demostró la actividad antileishmanial (*L. amazonensis*) de los derivados **XXIII** y **XXV**. La actividad (CI₅₀) del compuesto **XXV** contra formas promastigotes y amastigotes axénicos fue de 7.7 y 19.0 µg/mL y del compuesto **XXIII** fue de 21.3 y 28.7 µg/mL, respectivamente.

2.8.3 Generalidades de *Tournefortia hirsutissima* L.

Tournefortia hirsutissima L. (Boraginaceae) (Figura 2.9) es un arbusto nativo de México, América Central y del Sur y las Antillas. Además, crece en el sur de los Estados Unidos (Richardson & King 2009). En México, se conoce como "hierba rasposa" y las personas en la Sierra de Huautla, en el estado de Morelos, usan las hojas para lavar heridas, rozaduras, diarrea y la inflamación del riñón (Maldonado-Almanza 1997). Un uso tradicional contra la diabetes fue reportado por Andrade-Cetto y col. (Andrade-Cetto *et al.* 2007) quienes mencionan de este uso por la gente del estado de Veracruz, México. En Trinidad y Tobago, se usa para la hipertensión, ictericia y la diabetes (Lans 2006).

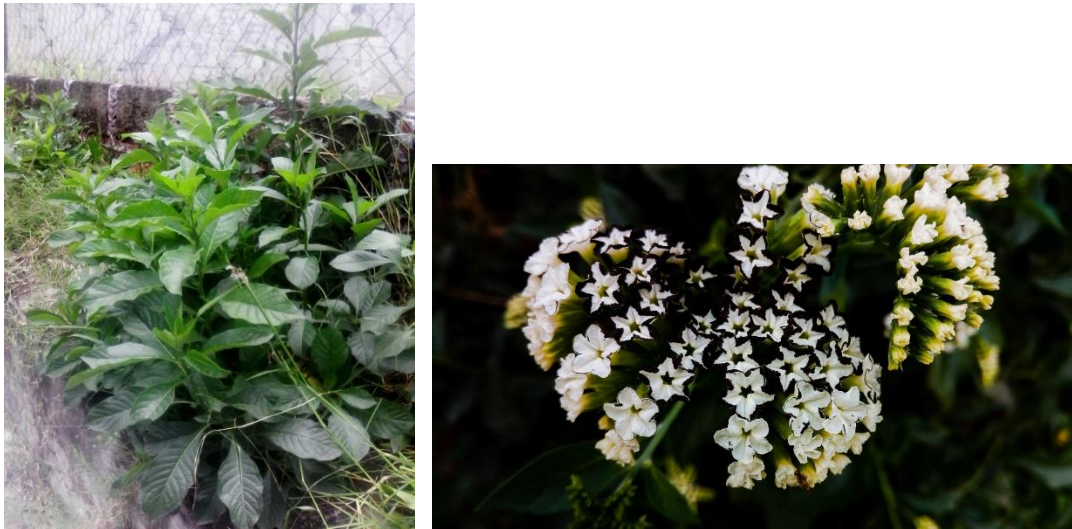


Figura 2.9. Fotos tomadas de *Tournefortia hirsutissima* L. (Izquierda: tallo y hoja; derecha: flores) en el municipio de Yautepec, Morelos.

2.8.4 Antecedentes químicos y farmacológicos de *T. hirsutissima*

Previo a la realización del presente proyecto de tesis, los únicos trabajos publicados en la literatura científica sobre esta especie se mencionan a continuación. Dos estudios por investigadores mexicanos validan el uso tradicional de esta especie contra la diabetes: Alarcón-Aguilar y col. en una prueba de tolerancia a la glucosa, administraron a conejos sanos una decocción de los tallos de *T. hirsutissima* a una concentración de 45 mg/kg. Los resultados mostraron una disminución significativa de la glucosa en la sangre solo después de 120 minutos de la primera administración de una solución de glucosa (2 g/Kg) en comparación con el grupo control (Alarcón-Aguilar *et al.* 1998); Andrade-Cetto y col. administraron oralmente extractos acuosos (20 y 80 mg/kg) y butanólicos (8 y 80 mg/kg) del tallo a ratas diabéticas, resultando en una disminución significativa de los niveles de glucosa en plasma en 3 horas (Andrade-Cetto *et al.* 2007). En otro trabajo, se desarrolló un material biomédico híbrido, conteniendo extracto de EtOH de las partes aéreas de *T. hirsutissima*, potencialmente útil en la curación de las ulceraciones del pie diabético. El análisis de este extracto por CG-EM reveló que el 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol) (14.9%), el mono (2-etilhexil) ftalato (21%) y el γ -sitosterol (16.4%) constituyen los componentes principales (Hernández *et al.* 2016).

3. JUSTIFICACION

El cáncer y la inflamación son dos problemas graves de salud pública en todo el mundo. El cáncer es el nombre designado a una colección de enfermedades que se caracterizan por células anormales que proliferan sin control, llegando a formar tumores, y que en 2018 causo 9.6 millones de defunciones a nivel global (Bray *et al.* 2018). Por otra parte, la inflamación es un proceso complejo de autoprotección que inicia como una respuesta a una lesión causada por estímulos dañinos, como los agentes irritantes o los patógenos. Sin embargo, la inflamación prolongada conduce a la patogénesis de una serie de enfermedades como la artritis, el asma e incluso el cáncer (Lu *et al.* 2006; Medzhitov 2008; Dinarello 2010).

Ahora bien, moléculas aisladas de fuentes naturales representan una parte importante de los fármacos actuales para tratar las enfermedades, siendo los fármacos contra el cáncer y como antibióticos los de mayor porcentaje. Más del 60% de los medicamentos actuales contra el cáncer se derivaron a partir de fuentes naturales. Por ejemplo, paclitaxel de *Taxus brevifolia* y vinblastina de *Catharanthus roseus* (Cragg & Pezzuto 2016).

Actualmente, se siguen descubriendo nuevos compuestos líderes a partir de fuentes naturales, que proporcionan nuevas vías para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos eficaces (Lu *et al.* 2006). Por lo tanto, la investigación de productos naturales sigue siendo un enfoque poderoso para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos y su desarrollo para la generación de nuevos fármacos.

En este contexto, se plantea una investigación dirigida a la búsqueda de moléculas activas contra el cáncer y la inflamación a partir de plantas nativas de México utilizadas en la medicina tradicional. *Porophyllum ruderale* es una especie que sintetiza compuestos derivados de tiofeno, y se propone la obtención de estos compuestos con posible actividad citotóxica. Asimismo, a partir de *Tournefortia hirsutissima*, se propone un estudio químico dirigido por la actividad antiinflamatoria. De este estudio se obtuvieron compuestos poliisoprenoides. Estos compuestos, además, fueron evaluados para su actividad citotóxica por su analogía estructural con dolicol fosfato, del cual se ha documentado una actividad apoptótica en células de leucemia humana.

4. HIPOTESIS

Los compuestos derivados de tiofeno que biosintetiza la especie *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* tienen actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer humano.

Extractos, fracciones y compuestos puros de las hojas de la especie *Tournefortia hirsutissima* L. tienen actividad antiinflamatoria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar compuestos con actividad citotóxica y antiinflamatoria a partir de *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* y *Tournefortia hirsutissima* L.

5.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar compuestos derivados de tiofeno a partir de *P. ruderale*.
- Llevar a cabo un estudio químico a partir de *T. hirsutissima* dirigido por la actividad antiinflamatoria en el edema agudo en oreja de ratón inducido por 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) y en la producción de óxido nítrico (NO) en células de macrófago RAW 264.7 estimuladas con lipopolisacárido (LPS).
- Caracterizar las estructuras químicas de las moléculas previamente purificadas, de ambas especies, mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM).
- Evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos derivados de tiofeno aislados de *P. ruderale*, y de los compuestos aislados de *T. hirsutissima* contra un panel de líneas celulares de cáncer humano y la línea celular IHH no cancerosa.
- Analizar el efecto de los compuestos con actividad antiproliferativa sobre el ciclo celular en las líneas celulares de cáncer humano más sensibles.
- Determinar el tipo de muerte celular que se induce por el tratamiento con compuestos seleccionados de *P. ruderale* o *T. hirsutissima* sobre las líneas celulares de cáncer humano más sensibles.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum*

6.1.1 Purificación y caracterización de los derivados de tiofeno (1–3)

La especie *Porophyllum ruderale* biosintetiza compuestos derivados de tiofeno. Estos se han aislado de las partes aéreas y de las raíces (Bohlmann & Zdero 1979; Bohlmann *et al.* 1980; Takahashi *et al.* 2011). El objetivo de este trabajo con esta especie comestible fue obtener los derivados de tiofeno, y posteriormente, determinar su actividad antiproliferativa contra un panel de líneas celulares de cáncer humano y sobre la línea celular IHH no cancerosa.

En línea con lo anterior, a partir de las raíces secas de *P. ruderale*, se obtuvieron los extractos de hexano, diclorometano (D-Pr), acetato de etilo (AT-Pr), acetona y metanol. Los extractos de D-Pr y AT-Pr se reunieron por su similitud en CCF. Posteriormente, se realizó un fraccionamiento primario de esta mezcla mediante un cromatógrafo de líquidos preparativo, utilizando una columna de gel de sílice Waters (19 x 150 mm, 10 µm) y un sistema de fase móvil CH₂Cl₂:CH₃OH en gradiente (desde 100:0 hasta 70:30, v/v) para obtener siete fracciones primarias (F1–F7). La fracción F1 se separó por cromatografía de fase reversa (C18), utilizando la fase móvil CH₃OH:H₂O en gradiente. Como resultado se obtuvieron 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**) y 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**). El compuesto 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**) se obtuvo a partir de la fracción F2 como sigue: F2 se sometió a un cromatógrafo de líquidos analítico utilizando la columna RP-18 Merck (100 x 4.6 mm) y un sistema de fase móvil de CH₃CN:H₂O en gradiente. El cromatograma resultante presentó seis picos principales con tiempos de retención de 1.05, 1.29, 1.48, 1.90, 2.31 y 2.65 min (Figura 6.1). La colección repetitiva del pico con tr de 1.29 min permitió la obtención del compuesto **3**. Los derivados de tiofeno **1–3** ya habían sido reportados para la especie *P. ruderale*, **1–3** se aislaron de las raíces (Bohlmann & Zdero 1979) y, **1** y **2** de las hojas (Bohlmann *et al.* 1980). En este trabajo, los compuestos **1–3** se identificaron mediante técnicas de RMN y EM por impacto electrónico (IE), y por la comparación con datos de la literatura.

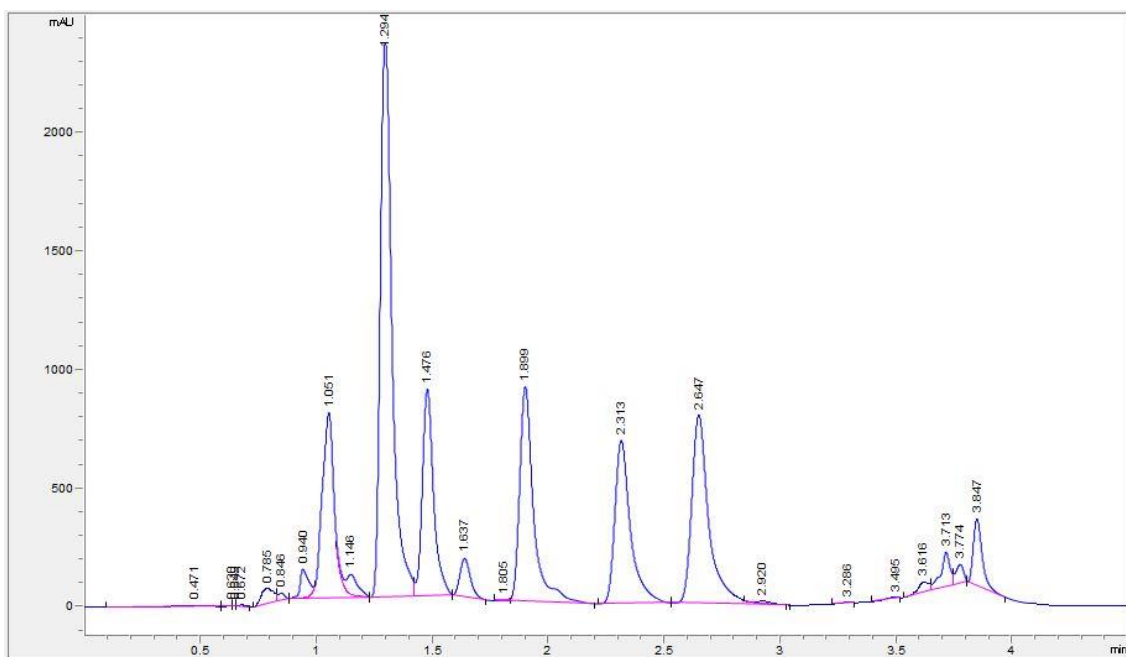
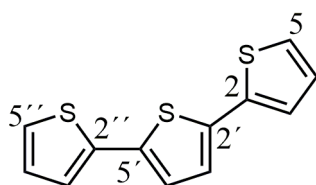


Figura 6.1. Cromatograma de la fracción F2 mediante CLAE a nivel analítico, monitoreado a 364 nm utilizando una columna Merck (Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm). La fase móvil un gradiente de CH₃CN-H₂O (desde 73:27 hasta 93:7, v/v) durante 4.5 min a un flujo de 2.0 mL/min. El volumen de inyección de la muestra fue de 15 µL (20 mg/mL). La colección repetitiva del pico con tiempo de retención de 1.29 min permitió obtener al compuesto **3**.

6.1.1.1 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**)



1

El compuesto 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**) se obtuvo como unas agujas incoloras y fue identificado mediante el análisis de su espectro de masas (Figura 6.2), su espectro de RMN ¹H (Figura 6.3) y por la comparación con datos de la literatura: el espectro de masas por IE del compuesto **1** presentó un ión molecular M⁺ como el pico base a *m/z* 248 correspondiente con la fórmula molecular C₁₂H₈S₃. La

contribución isotópica del pico M+2 a m/z 250 con una abundancia relativa de aproximadamente 13.5% fue muy importante para confirmar la presencia de tres átomos de azufre conformando la molécula.

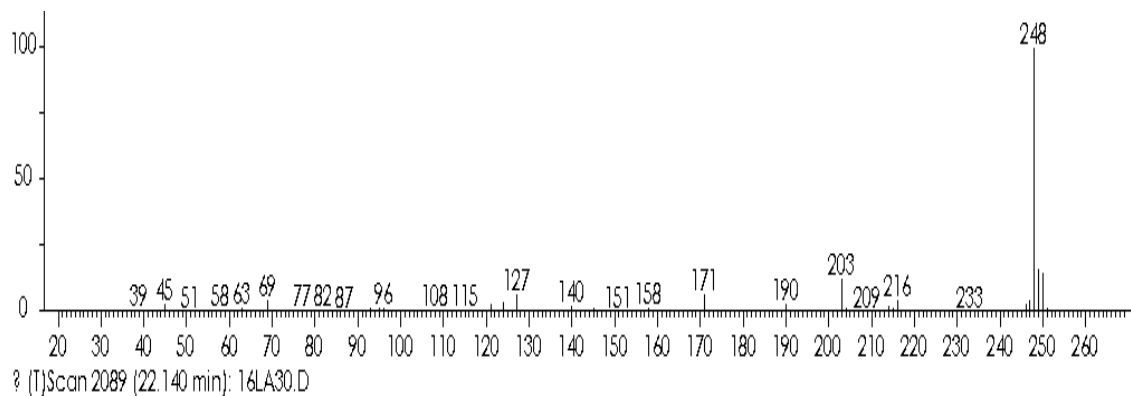


Figura 6.2. Espectro de masas por impacto electrónico de 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**).

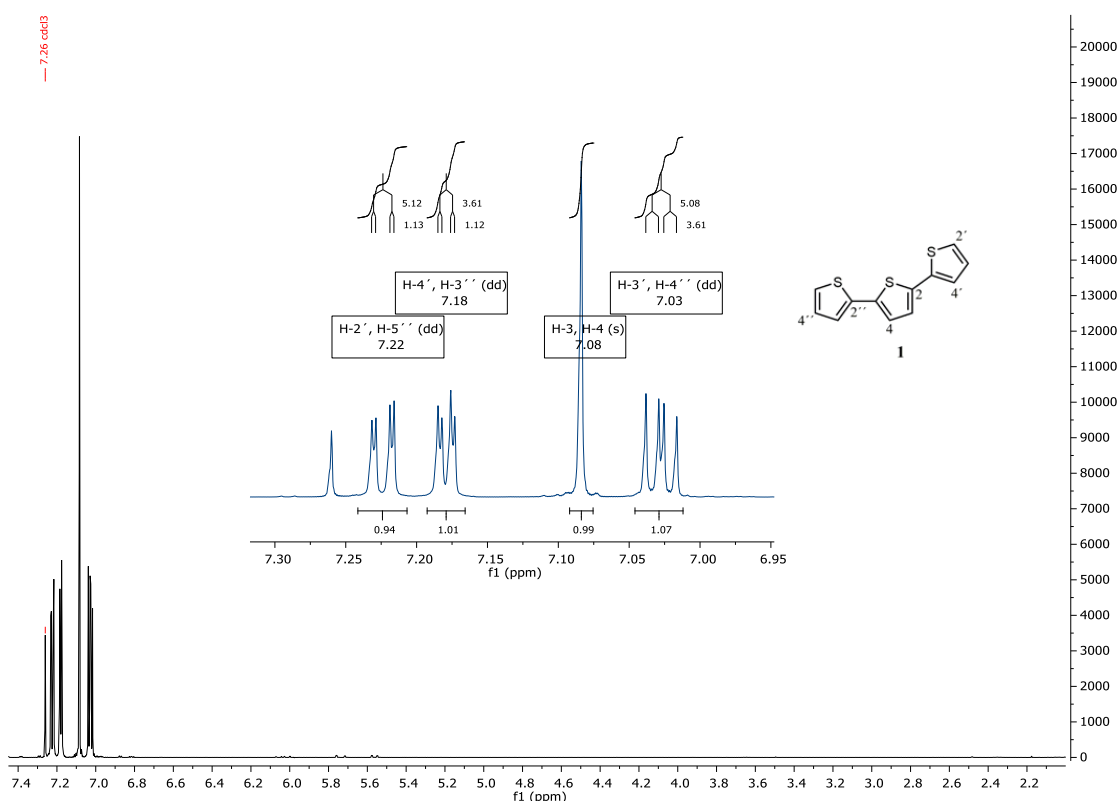
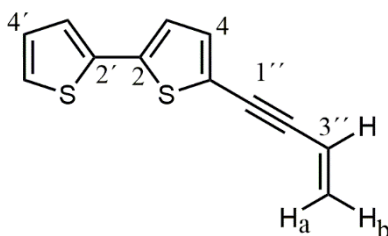


Figura 6.3. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**) en negro y expansiones en azul.

El espectro de RMN ^1H del compuesto **1** presentó 3 señales doble de dobles a δ_{H} 7.22 (2H, $J = 5.1, 1.1$ Hz), 7.18 (2H, $J = 3.6, 1.1$ Hz) y 7.03 (2H, $J = 5.1, 3.6$ Hz). De acuerdo con las constantes de acoplamiento, estas resonancias se asignaron como: δ_{H} 7.22 (H-2' y H-5''); δ_{H} 7.18 (H-4' y H-3''); δ_{H} 7.03 (H-3' y H-4''). Además, una señal a δ_{H} 7.08 (2H, s) correspondiente a los protones 3 y 4 del anillo de tiofeno central. Estos datos de RMN ^1H corresponden a lo reportado en la literatura para 2,2':5',2''-tertiofeno (Coogan *et al.* 1965; Ibrahim *et al.* 2016).

6.1.1.2 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**)



2

El compuesto **2** se obtuvo como un polvo amarillo y se identificó por el análisis de RMN 1D y 2D (COSY, HSQC y HMBC), su espectro de masas y por la comparación con datos de la literatura: el espectro de masas por IE de **2** (Figura 6.4) presentó un ión molecular M^+ como el pico base a m/z 216 correspondiente con la fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{S}_2$. La presencia de dos átomos de azufre en la molécula se confirmó por la contribución isotópica mediante el pico $\text{M}+2$ a m/z 218 con una abundancia relativa de aproximadamente 9%.

El espectro de RMN ^1H del compuesto **2** (Figura 6.5) presentó 8 señales bien diferenciadas correspondientes a 8 protones: δ_{H} 7.23 (1H, dd, $J = 5.1, 1.2$ Hz, H-5'), 7.18 (1H, dd $J = 3.6, 1.2$ Hz, H-3'), 7.10 (1H, d $J = 3.8$ Hz, H-4), 7.04 (1H, d $J = 3.8$ Hz, H-3), 7.02 (1H, dd $J = 5.1, 3.6$ Hz, H-4'), 6.03 (1H, dd $J = 17.5, 11.3$ Hz, H-3''), 5.73 (1H, dd $J = 17.5, 2.0$ Hz, H-4a'') y 5.56 (1H, dd $J = 11.3, 2.0$ Hz, H-4b''). Estos datos corresponden a lo reportado en la literatura para 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**) (Coogan *et al.* 1965; Ibrahim *et al.* 2016).

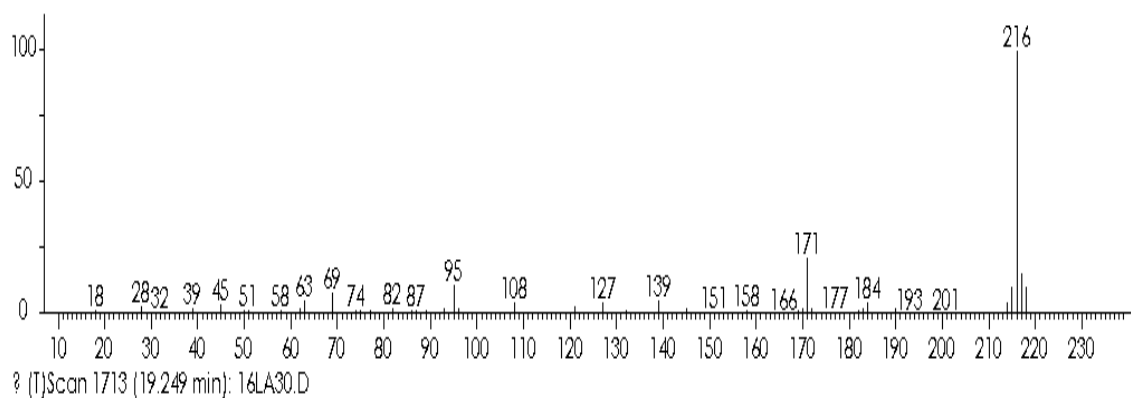


Figura 6.4. Espectro de masas por impacto electrónico (IE) de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**).

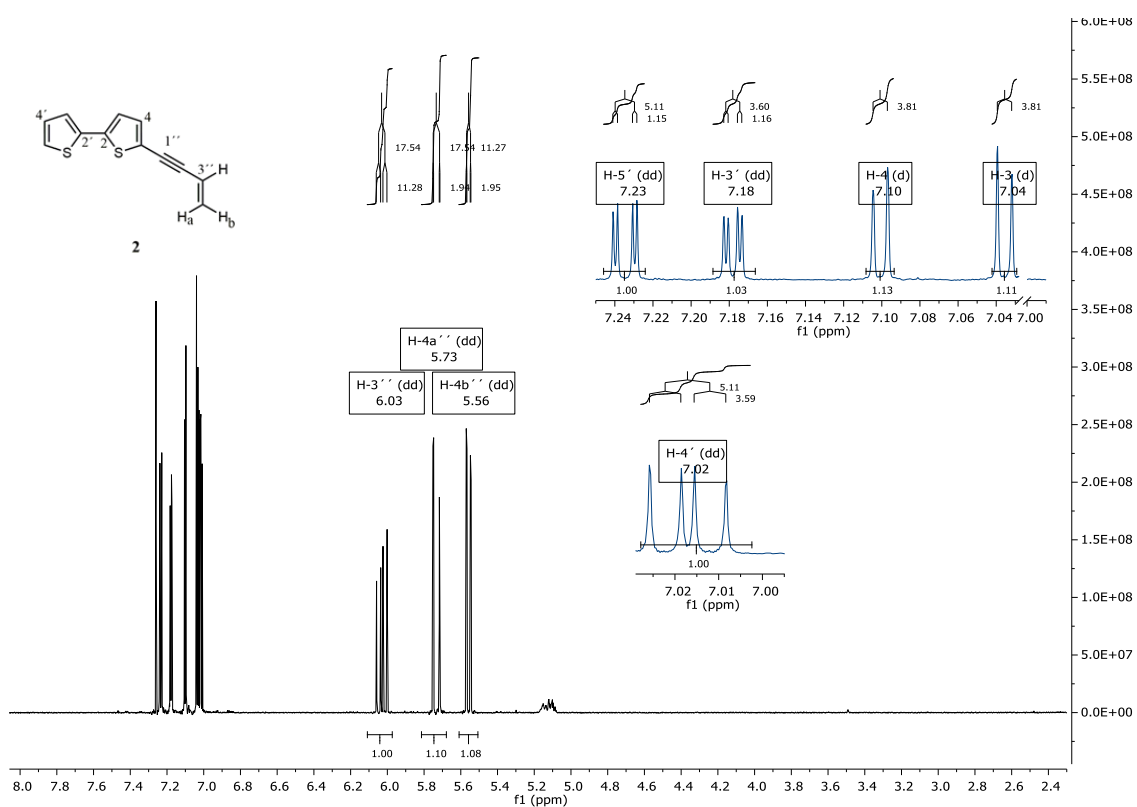


Figura 6.5. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**) en negro y expansiones de la región aromática en azul.

La señal de protón desplazada a campo más bajo a δ_H 7.23 (dd, $J = 5.1, 1.2$ Hz) se asignó al protón H-5' de acuerdo a la multiplicidad y a los valores de las constantes de acoplamiento. En el espectro COSY, la señal H-5' presentó una correlación con H-4', y a su vez H-4' presentó una correlación con H-3' (Figura 6.6). El sistema ABX correspondiente a los protones del doble enlace fue identificado por las correlaciones en COSY, H-3'' con H-4a'' y H-4b'' y H-4a'' con H-4b'' (Figura 6.7).

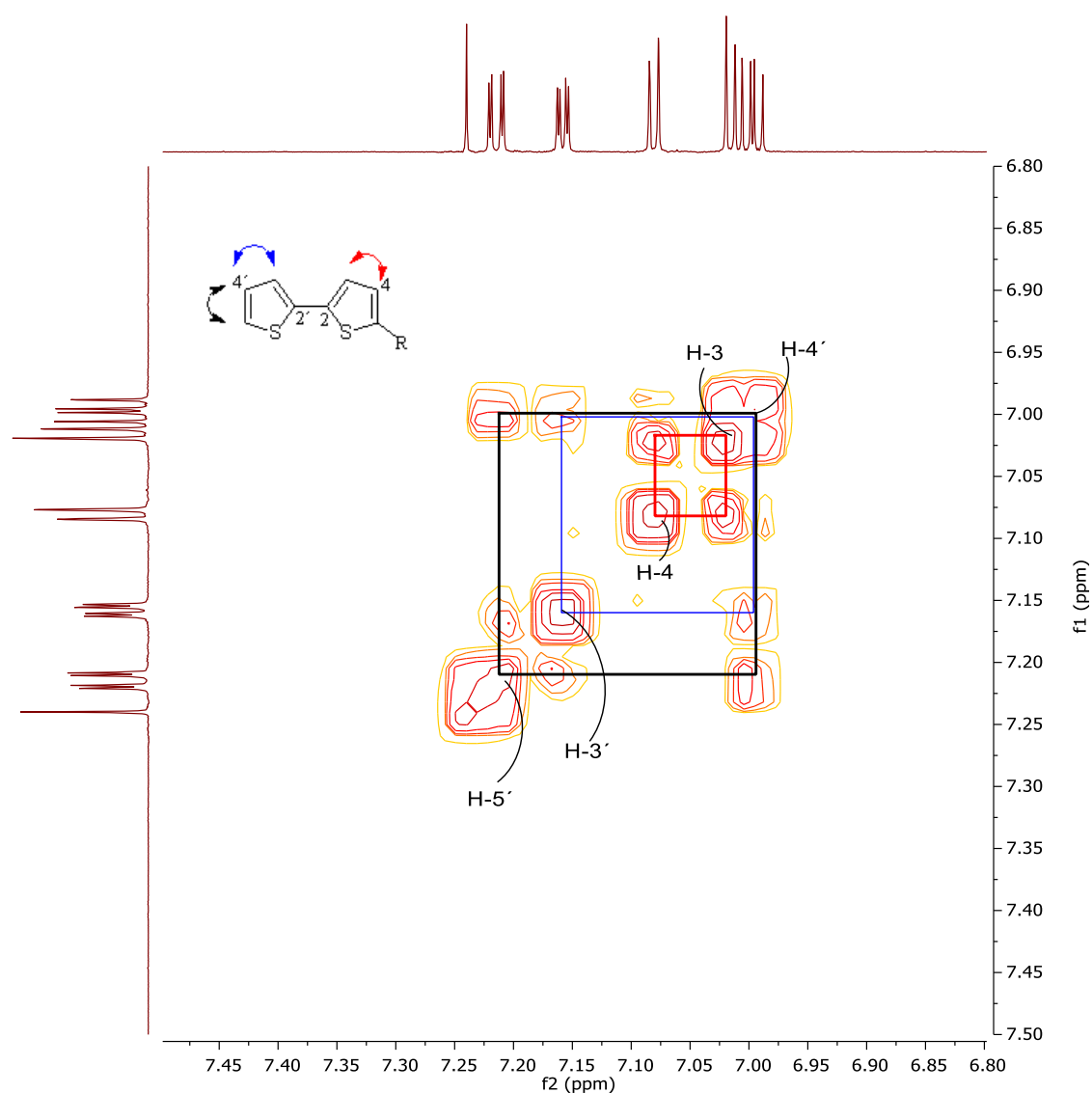


Figura 6.6. Región aromática del espectro COSY de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).

Las resonancias de RMN C^{13} (espectro 1, anexo) fueron establecidas con los espectros HSQC (espectro 2, anexo) y HMBC. A continuación, se mencionan algunas correlaciones clave: la señal a δ_c 93.10 corresponde al C-2'' por su correlación en el espectro HMBC a tres enlaces con H-4b'' y H-4a'', la señal a δ_c 80.37 corresponde al otro carbono acetilénico, C-1'' por su correlación HMBC a tres enlaces con H-3''. Finalmente, los protones H-3 y H-4 se lograron diferenciar por el acoplamiento HMBC a tres enlaces H-4 con C-1'' (Figura 6.8).

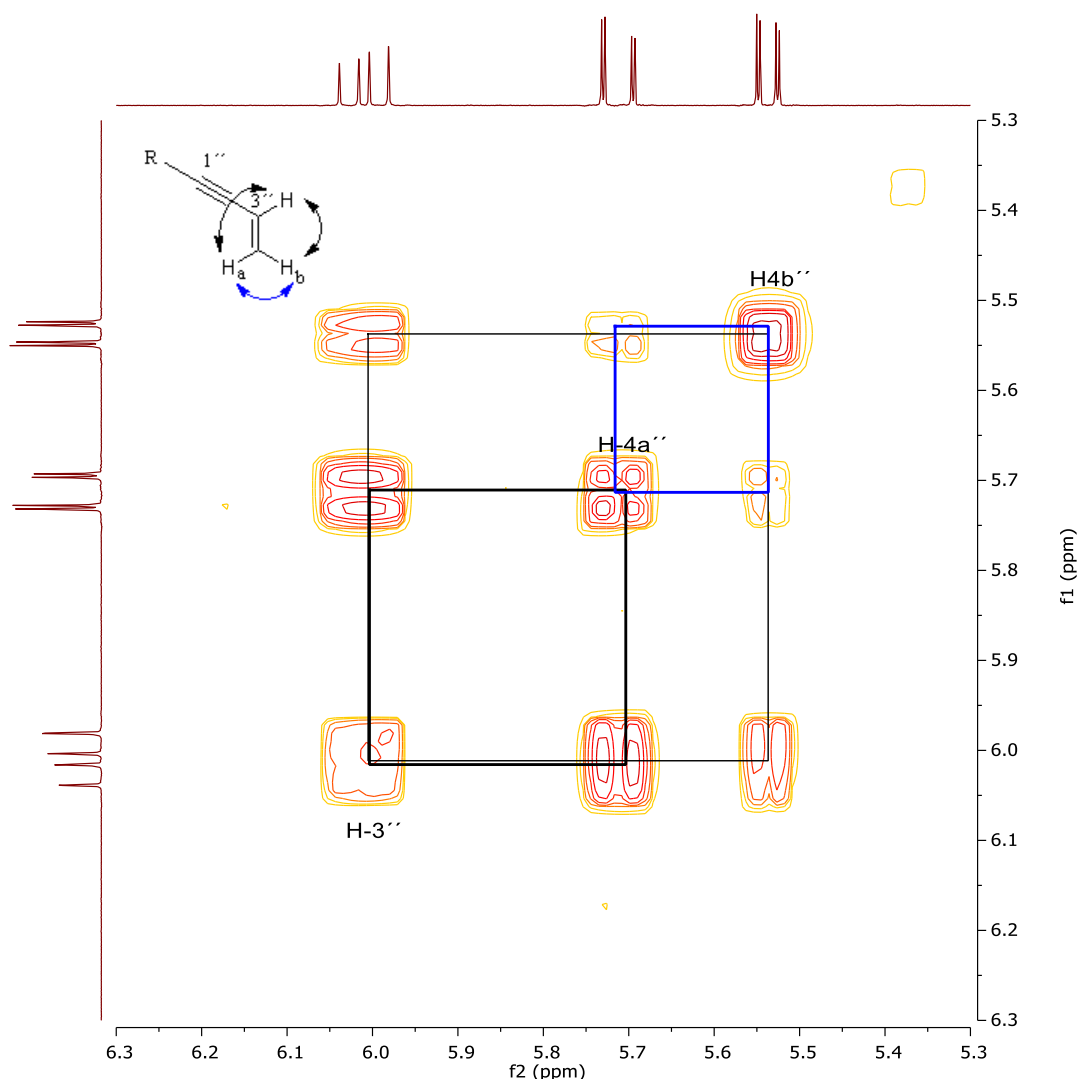


Figura 6.7. Región del sistema ABX del espectro COSY de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**).

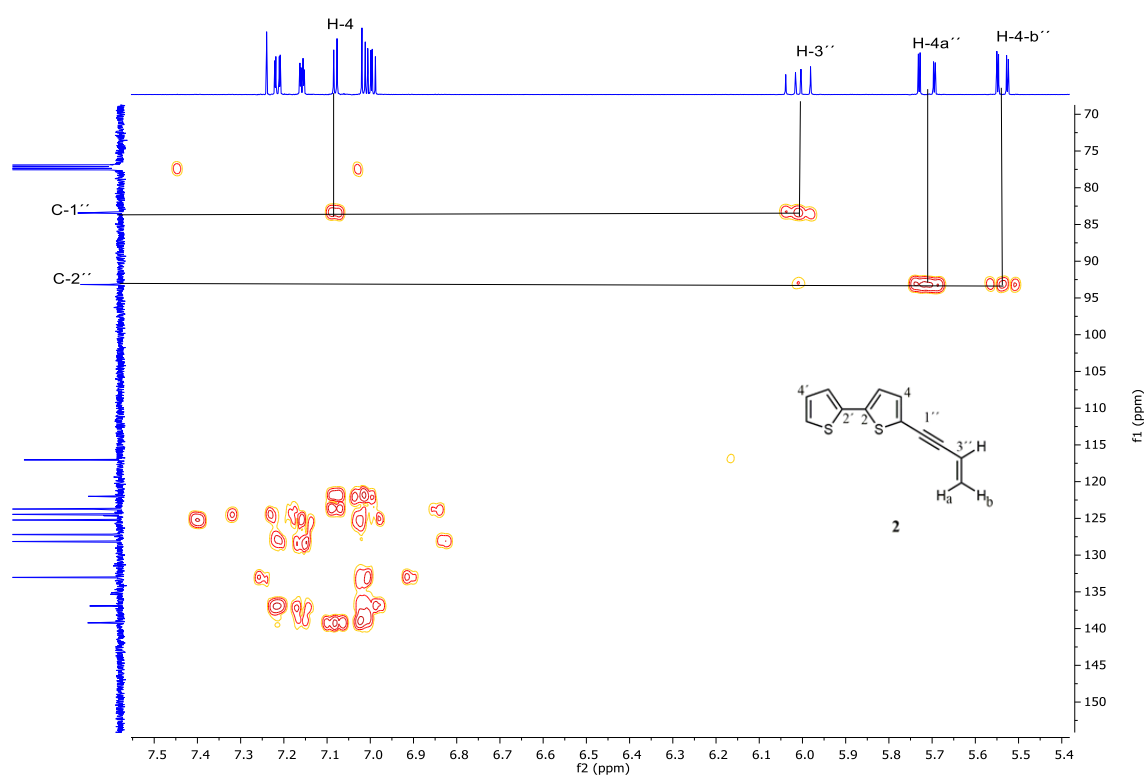
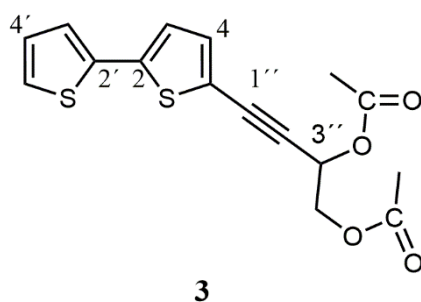


Figura 6.8. Espectro HMBC de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**).

6.1.1.3 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**)



El compuesto 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**) se obtuvo como un aceite amarillo-oscuro y se identificó por RMN 1D y 2D (HSQC y HMBC), su espectro de masas y la comparación con datos de la literatura: el espectro de RMN ^1H (Figura 6.9), presentó desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento muy similares para los protones de los anillos de tiofeno en comparación con el compuesto **2**. Sin embargo, cambios notables se observaron en los desplazamientos

químicos y constantes de acoplamiento de los protones H-3'', H-4a'' y H-4b''. H-3'' (dd, δ_H 5.86, $J = 7.4, 3.7$), H-4a'' y H-4b'' (dd, δ_H 4.43 ($J = 11.8, 3.7$) y dd, δ_H 4.31 ($J = 11.8, 7.4$)). Estos cambios son debidos a dos grupos acetoxi que se establecieron por las resonancias δ_C 169.87, δ_C 21.04 y δ_H 2.15, y δ_C 170.59, δ_C 20.89 y δ_H 2.11. La siguiente correlación H-4'' (δ_H 4.31) - C carbonílico (δ_C 170.59) de HMBC a tres enlaces (Figura 6.10) establece la unión de este grupo acetoxi a la posición C-4''. Estos datos de RMN 1H y de RMN ^{13}C corresponden a los reportados en la literatura para 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**) (Menelaou *et al.* 1991; Ibrahim *et al.* 2016).

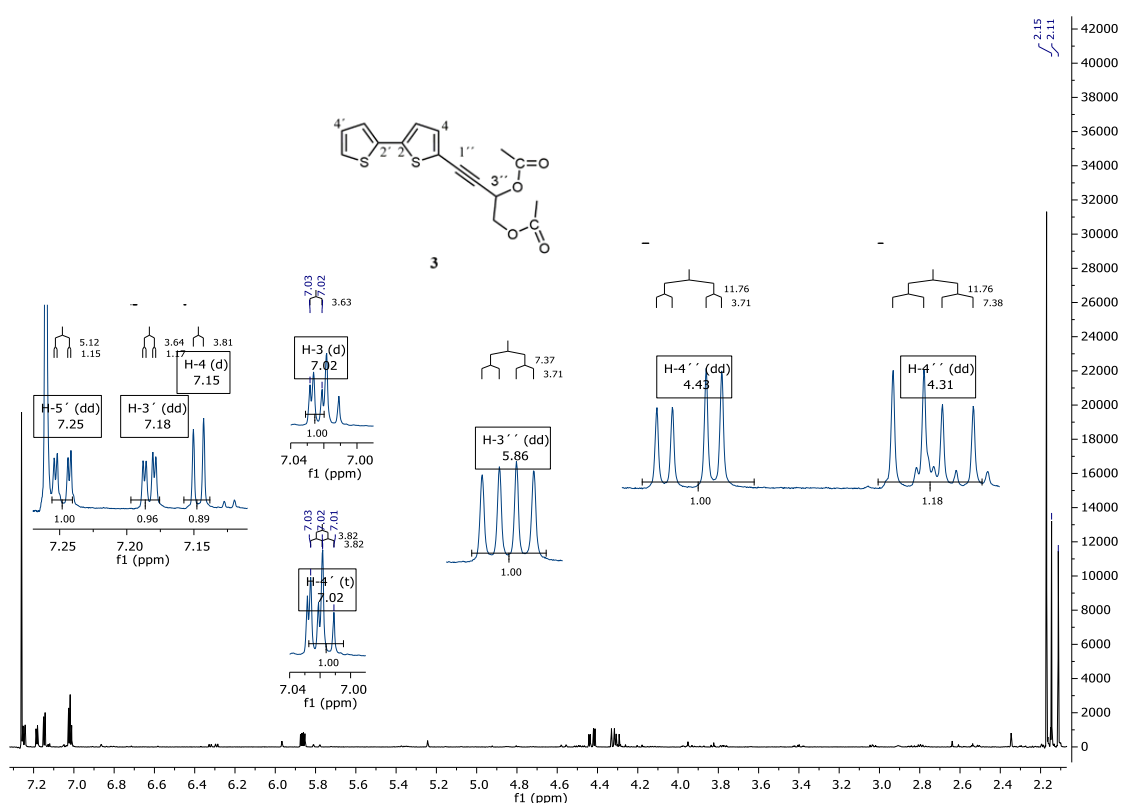


Figura 6.9. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**) en negro y expansiones en azul.

El espectro de masas por IE del compuesto **3** (Figura 6.11) presentó un ión molecular M^+ a m/z 334 correspondiente con la fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_2S_2$. El pico base a m/z 232 corresponde a la especie $M^+ - CH_3COO \cdot - CH_3CO \cdot$, y se sustenta por la intensidad del pico isotópico $M+2$ del fragmento resultante a m/z 234 que

explica el fragmento con los dos átomos de azufre. Los datos de masas son similares a los reportados en la literatura para 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**) (Ibrahim *et al.* 2016).

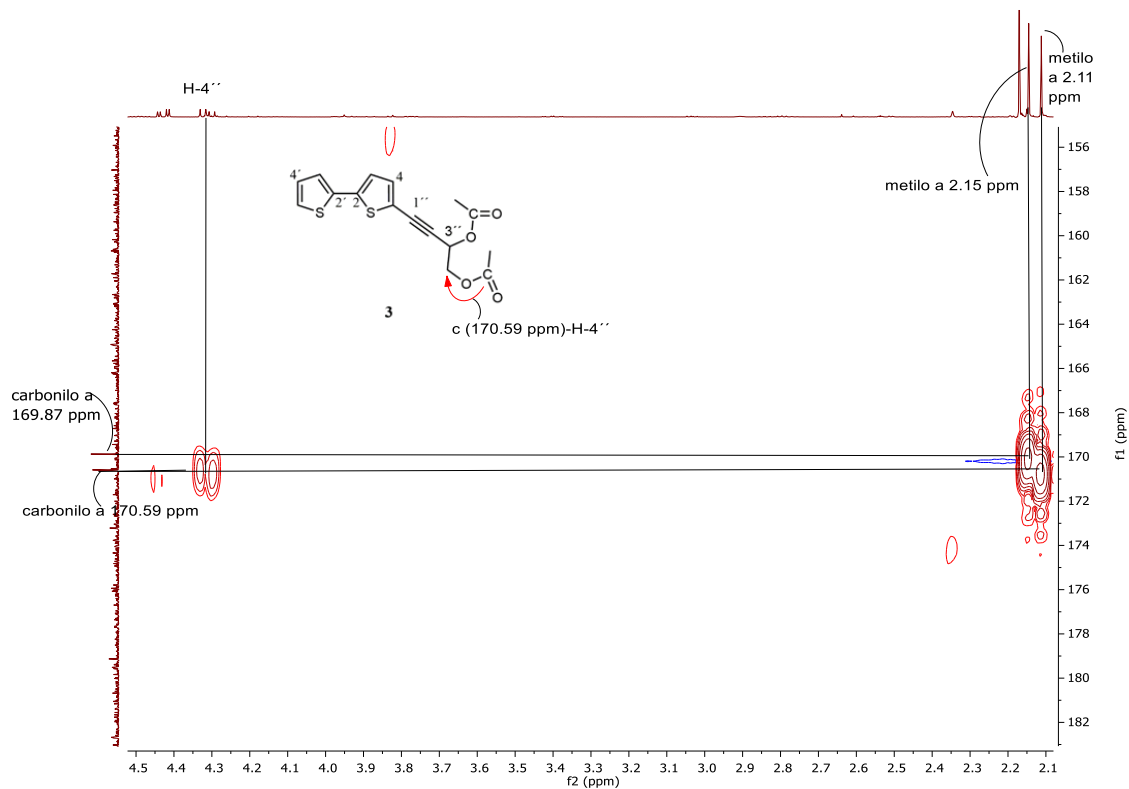


Figura 6.10. Expansión del espectro HMBC de 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**).

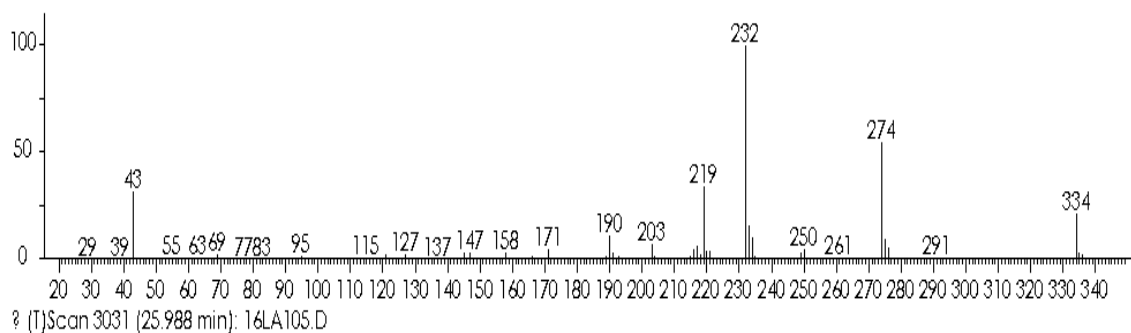


Figura 6.11. Espectro de masas por impacto electrónico (IE) de 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**).

6.1.2 Actividad antiproliferativa de los derivados de tiofeno (1–3)

Los derivados de tiofeno **1–3** se evaluaron para su actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer humano Hep3B, HepG2 (hepatocelular), A549 (pulmón) y HeLa (cérvico uterino), y contra la línea celular IHH no cancerosa mediante el ensayo de MTS. Los resultados de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) se resumen en la Tabla 1. Los compuestos **1–3** presentaron mayor actividad antiproliferativa contra las líneas celulares Hep3B y HepG2, destacando la CI₅₀ de **1** contra Hep3B = 3.6 ± 0.3 µg/mL, la CI₅₀ de **2** contra HepG2 = 14.1 ± 1.3 µg/mL y la CI₅₀ de **3** contra Hep3B = 15 ± 3 µg/mL. La actividad antiproliferativa de los compuestos **1–3** exhibida en las células IHH fue menor que la exhibida en las células de cáncer hepatocelular con valores de CI₅₀ de 85 ± 13 (compuesto **1**), 100 ± 10 (compuesto **2**) y 57 ± 3 µg/mL (compuesto **3**). Estos datos, demuestran que **1–3** presentan selectividad hacia las líneas celulares de cáncer Hep3B y HepG2.

Anteriormente, se han publicado trabajos de compuestos derivados de tiofeno con actividad citotóxica aislados de varias especies de plantas: los compuestos derivados de tiofeno, grijisina A y grijisona A, se aislaron de *Echinops grijissi* Hance y mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer humano HL-60, K562 y MCF7 con valores de CI₅₀ entre 18.9 y 50.0 µg/mL, siendo más activo el tiofeno grijisona A (Zhang *et al.* 2008); en otro estudio sobre esta especie, se aislaron ocho derivados de tiofeno y fueron evaluados sobre las líneas celulares HL-60, K562, MCF7 y HepG2. Las actividades citotóxicas de estos derivados de tiofeno fueron variadas, destacando el (2-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-5-(prop-1-inil)-tiofeno con una CI₅₀ de 8 µg/mL frente a HL60 y el 5-(3-acetoxi-4-isovalero-iloxibut-1-inil)-2,2-bitiofeno con valores de CI₅₀ de 7 y 1.8 µg/mL frente a K562 y HepG2, respectivamente (Jin *et al.* 2008). En el trabajo de Jin y colaboradores, también se aislaron los compuestos **1–3** aislados aquí de *Porophyllum ruderale*. La actividad antiproliferativa de los compuestos **1** (CI₅₀ = 11.8 ± 1.3 µg/mL) y **3** (CI₅₀ = 18 ± 3 µg/mL) determinada en este trabajo frente a HepG2 está de acuerdo con los datos reportados por Jin y col.: CI₅₀ de 10 y 18 µg/mL para **1** y **3**, respectivamente. Sin embargo, la actividad antiproliferativa de **2** frente a HepG2 (CI₅₀ = 14.1 ± 1.3 µg/mL) contrasta con la reportada anteriormente (CI₅₀ > 50 µg/mL); en un estudio más

reciente, a partir de *Tagetes minuta* L. se aisló un nuevo quinetiofeno (Ibrahim & Mohamed 2017), la tiotagetina A, la cual mostró actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer KB y MCF7 con valores de ED₅₀ de 2.03 y 3.88 µg/mL, respectivamente.

Tabla 6.1 Valores de Cl₅₀ en µg/mL de los derivados de tiofeno 1–3 contra 4 líneas celulares de cáncer humano y una no cancerosa (IHH).

Compuesto	HepG2	Hep3B	A549	HeLa	IHH
1	11.8 ± 1.3	3.6 ± 0.3	27 ± 6	21.1 ± 5	85 ± 13
2	14.1 ± 1.3	20.1 ± 0.2	26 ± 4	30 ± 7	100 ± 10
3	18 ± 3	15 ± 3	N.D. ^b	N.D.	57 ± 3
PTX	0.0065 ± 0.0007 ^a	0.008 ± 0.001 ^a	N.D.	0.01 ± 0.002 ^a	0.08 ± 0.005 ^a

^a Cl₅₀ del control positivo paclitaxel (PTX) en µM, ^b N.D. (No determinado).

6.1.3 Efecto de los derivados de tiofeno (1–3) sobre el ciclo celular

La línea celular Hep3B se seleccionó para analizar el efecto de los derivados de tiofeno 1–3 sobre la progresión del ciclo celular. Los compuestos fueron evaluados a su Cl₅₀ (ver, Tabla 1) y el análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 6.12. Se utilizó paclitaxel (PTX) como un control positivo de la detención de la fase G₂/M. Los tres derivados de tiofeno (1–3), indujeron un aumento en sub-G₁, de 0.9 a 13.8% (compuesto 1), de 0.9 a 11.2% (compuesto 2) y de 0.0 a 19.9% (compuesto 3). El aumento en sub-G₁ inducido por compuestos químicos se ha correlacionado con la muerte celular por apoptosis (Ormerod *et al.* 1992; Liang *et al.* 2012; Lee *et al.* 2015). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para demostrar este tipo de muerte celular. Asimismo, el compuesto 2 indujo la detención de la fase S (de 16.2 a 25.1%; Fig. 6.12 A), el compuesto 3 indujo la detención de la fase G₂/M (de 29.6 a 56.9%; Fig.

6.12 B) y el compuesto **1** no indujo detención significativa del ciclo celular en cualquiera de las tres fases G₁, S o G₂/M. La diferencia del efecto inducido por los compuestos **1** (aumento en sub-G₁), **2** (aumento en sub-G₁ y detención en S) y **3** (aumento en sub-G₁ y detención en G₂/M) sobre la progresión del ciclo celular, demuestra que los compuestos **1–3** actúan sobre diferentes mecanismos de acción, sin embargo, los tres compuestos culminan con un efecto citotóxico sobre las células Hep3B. Este es el primer trabajo sobre la actividad antiproliferativa de los compuestos **1–3** sobre las células Hep3B, A549, HeLa e IHH, y su efecto sobre el ciclo celular en Hep3B. Este trabajo, abre el camino para más estudios sobre los compuestos **1–3**, dirigidos a determinar el tipo de muerte celular inducida y su mecanismo de acción sobre las células Hep3b. Hasta la fecha, solo se ha demostrado la actividad apoptótica de un derivado de tiofeno aislado de una fuente natural: en el estudio realizado por Lee y colaboradores, a partir de *Eclipta prostata* se aislaron cinco derivados de tiofeno. Los compuestos presentaron actividad antiproliferativa diferencial contra las líneas celulares de cáncer endometrial humano Hec 1A (CI₅₀ desde 0.38 ± 0.04 hasta 129.85 ± 11.53 µM) e Ishikawa (CI₅₀ desde 0.35 ± 0.02 hasta 9.68 ± 0.44 µM). α-tertienilmetanol, fue el que presentó la mayor actividad antiproliferativa contra ambas líneas celulares. En el ciclo celular, α-tertienilmetanol, no indujo detención de las fases G₁, S o G₂/M, sin embargo, indujo un incremento de sub-G₁ con un efecto dependiente de la concentración. Esta muerte celular inducida fue mediada por apoptosis, como lo demuestra la tinción de las células con Anexina V/IP. Además, el α-tertienilmetanol desencadenó la activación de las caspasas-3, -8 y -9, y la liberación de citocromo C en el citosol (Lee *et al.* 2015).

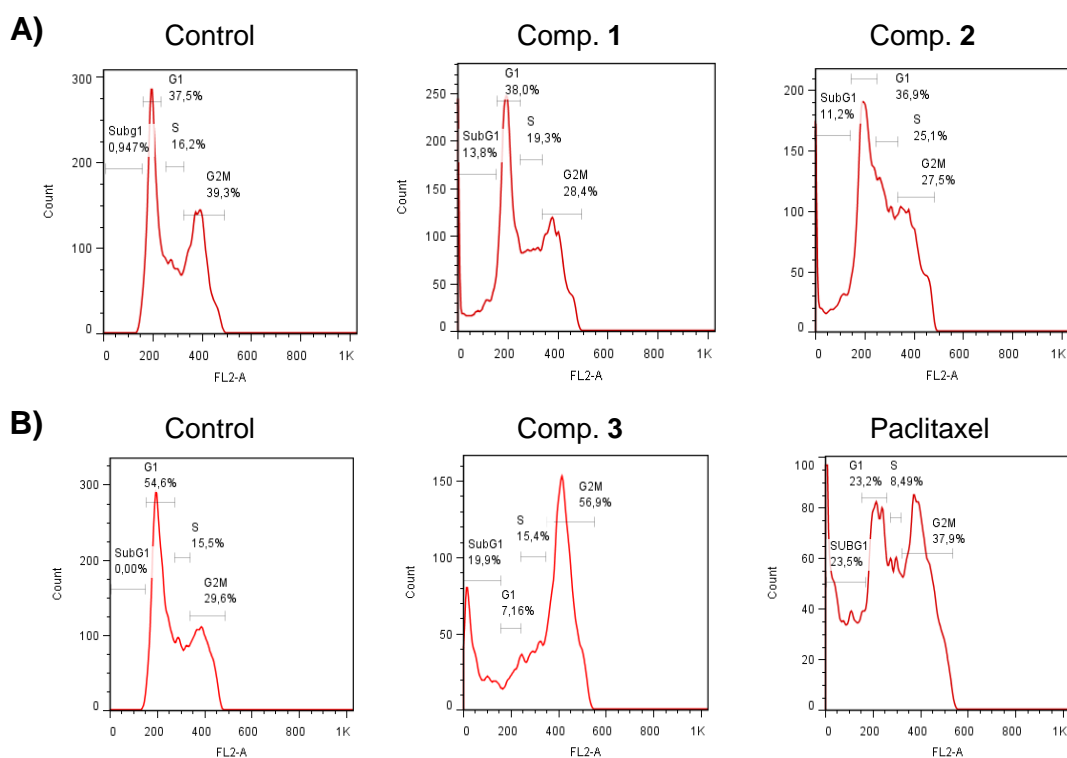


Figura 6.12. Ciclo celular de las células Hep3B después del tratamiento con los compuestos 1–3 a su Cl_{50} durante 24 h mediante citometría de flujo. A) Control y compuestos 1 y 2, B) Control, compuesto 3 y paclitaxel (PTX) a 10 nM.

6.2 *Tournefortia hirsutissima*

A partir de las hojas de *T. hirsutissima* se obtuvieron los extractos de *n*-hexano (H-Th), diclorometano (D-Th) e hidroalcohólico (HA-Th) y estos fueron evaluados para sus actividades antiinflamatorias y antiproliferativa.

6.2.1 Actividades antiinflamatorias de *Tournefortia hirsutissima*

6.2.1.1 Evaluación *in vivo*

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos en un modelo murino de edema agudo inducido por 13-acetato-12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA). Los extractos de H-Th, D-Th e HA-Th se evaluaron en ratones ICR macho a una dosis de 1.0

mg/oreja. El extracto de H-Th tuvo el mejor efecto antiedema con una inhibición del $78.0 \pm 1.5\%$. Se encontró un efecto similar con el control positivo (indometacina) que mostró una inhibición del edema del $87.6 \pm 0.4\%$ a una dosis de 1.0 mg/oreja. Los extractos de D-Th e HA-Th fueron menos activos con valores de inhibición del $45.0 \pm 6.7\%$ y $28.7 \pm 12.5\%$, respectivamente. En la Figura 6.13 se muestran los porcentajes de los edemas.

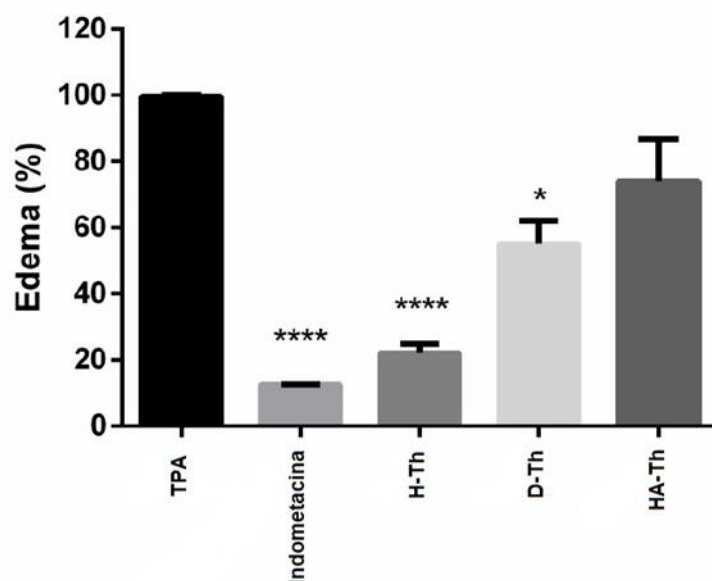


Figura 6.13. Efecto de inhibición del edema inducido por TPA en la oreja de ratón, de los extractos de *n*-hexano (H-Th), diclorometano (D-Th) e hidroalcohólico (HA-Th) de las hojas de *T. hirsutissima* e Indometacina a dosis de 1 mg/oreja. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $P < 0.0001$ comparado al TPA.

6.2.1.2 Evaluación *in vitro*

Se evaluó el efecto de los extractos en la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. El NO, a concentraciones altas es un mediador proinflamatorio, y se produce en un proceso inflamatorio después de un estímulo como el LPS de las bacterias gramnegativas. El nitrito (NO_2^-) es una especie estable del NO y fue utilizado como un indicador de la producción del NO. Los resultados mencionados a continuación se muestran en las

Figuras 6.14 y 6.15. Las células tratadas solo con LPS mostraron el 100% de la acumulación de nitrito (o producción de NO). El tratamiento de las células con indometacina (control positivo) inhibió la producción del NO en un $54.6 \pm 8.9\%$ a $30 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$).

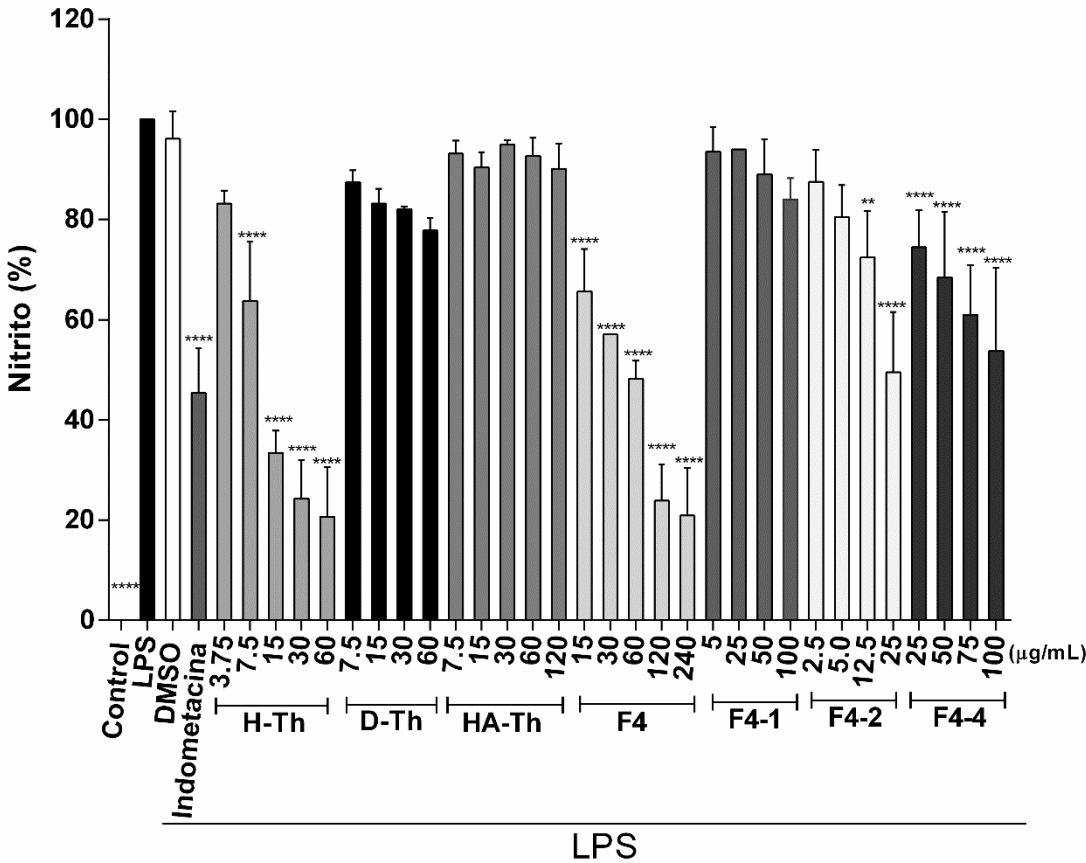


Figura 6.14. Efecto de los extractos de H-Th, D-Th e HA-Th y las fracciones F4, F4-1, F4-2 y F4-4 sobre la inhibición de la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Las células se trataron con las muestras investigadas a las dosis indicadas, DMSO (0.4%, v/v) o indometacina (30 $\mu\text{g/mL}$) 2 h antes de la estimulación con LPS (1.0 $\mu\text{g/mL}$) durante 21 h. El nitrito se determinó por el método de Griess y se expresa en porcentaje. Todos los datos representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes cada uno por triplicado. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ en comparación con el grupo tratado solo con LPS.

El extracto de H-Th ($75.7 \pm 7.7\%$ de inhibición a $30 \mu\text{g/mL}$) resultó ser más activo que la indometacina y presentó un efecto dependiente de la concentración con una $\text{CI}_{50} = 11.2 \mu\text{g/mL}$. La inhibición del NO por el H-Th, no se debió a un efecto citotóxico, ya que no afectó la viabilidad celular de las células RAW 264.7 hasta una concentración de $60 \mu\text{g/mL}$. En contraste, tanto el extracto de D-Th (hasta $60 \mu\text{g/mL}$) como el extracto HA-Th (hasta $120 \mu\text{g/mL}$) no presentaron un efecto inhibitorio significativo del NO. Es importante destacar que el vehículo DMSO (0.4% , *v/v*) no afectó significativamente tanto la viabilidad celular, así como la producción del NO.

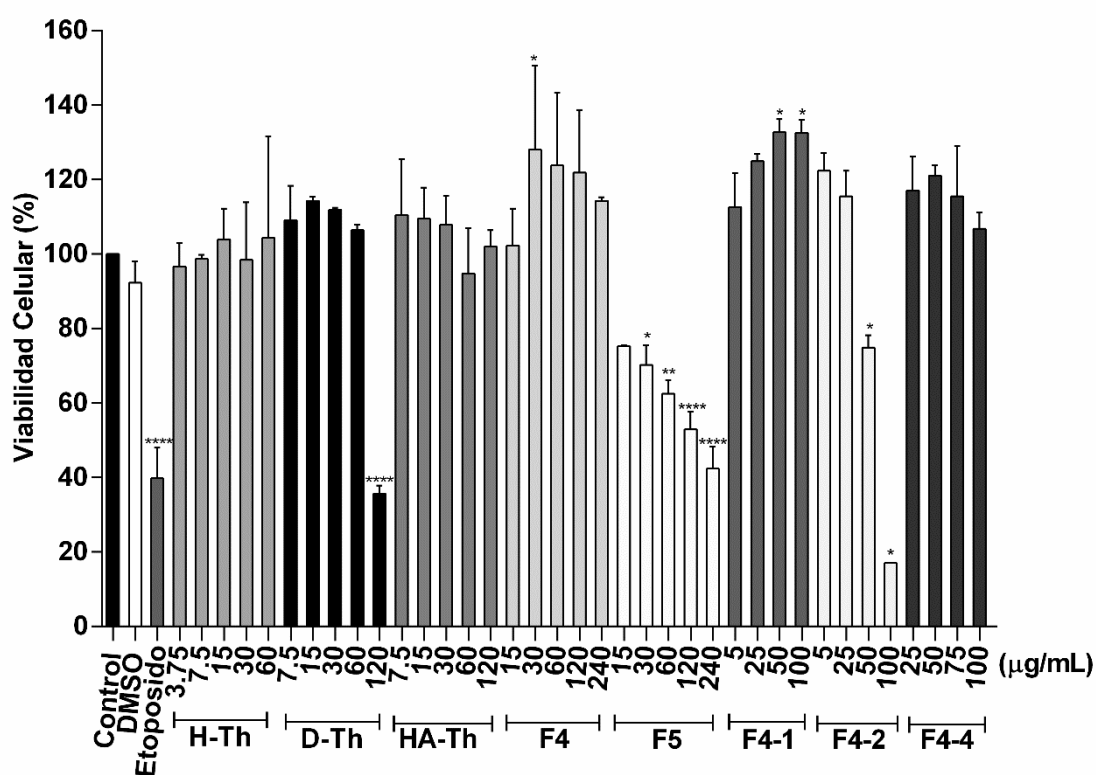


Figura 6.15. Efecto de los extractos de H-Th, D-Th e HA-Th y las fracciones F4, F5, F4-1, F4-2 y F4-4 a las dosis indicadas sobre la viabilidad celular de las células RAW 264.7 utilizando el ensayo de MTS. La viabilidad celular se expresa en porcentaje. Todos los datos representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ en comparación con el grupo de células control (sin tratamiento).

6.2.2 Actividad antiproliferativa de *Tournefortia hirsutissima*

La actividad antiproliferativa de los extractos de H-Th, D-Th e HA-Th se evaluó contra las líneas celulares de cáncer humano Hep3B y HepG2 (hepatocelular) utilizando el ensayo de MTS. También se incluyó la línea celular IHH (hepatocitos humanos inmortalizados) como un control de células no cancerosas. Los resultados indicaron que el extracto de H-Th mostró el mayor efecto antiproliferativo con valores de CI_{50} de 32.7 ± 0.9 contra Hep3B, y 21.6 ± 1.9 $\mu\text{g/mL}$ contra HepG2. Estas células fueron menos sensibles contra HA-Th ($CI_{50} = 36.1 \pm 1.5$ $\mu\text{g/mL}$ en Hep3B y $CI_{50} = 31.0 \pm 1.4$ $\mu\text{g/mL}$ en HepG2). El extracto de D-Th fue el de menor efecto antiproliferativo, con un valor de CI_{50} de 33.6 ± 2.2 $\mu\text{g/mL}$ contra HepG2, y un efecto antiproliferativo despreciable en células Hep3B con un efecto inhibitorio en la proliferación celular $< 50\%$ a 100 $\mu\text{g/mL}$. Los tres extractos tuvieron un efecto antiproliferativo menor sobre las células IHH: $CI_{50} = 77 \pm 7$ $\mu\text{g/mL}$ (H-Th); $CI_{50} > 100$ $\mu\text{g/mL}$ (D-Th); 84 ± 10 $\mu\text{g/mL}$ (HA-Th). Estos resultados sugieren, que los extractos contienen compuestos con selectividad hacia las células cancerosas.

6.2.3 Estudio químico biodirigido de *Tournefortia hirsutissima*

Los resultados de actividad biológica y farmacológica descritos anteriormente para los extractos de *T. hirsutissima* indicaron que el extracto de *n*-hexano (H-Th) presentó los mayores efectos inhibitorios en el edema y la producción del NO, así como el mayor efecto antiproliferativo. Por lo tanto, este extracto se analizó mediante RMN de ^1H (Figura 6.16) y ^{13}C (Figura 6.17), y la técnica acoplada de CG-EM. Las señales de ^1H indicaron la presencia de poliprenoles como los componentes más abundantes por las señales δ_{H} 5.5-5.0 (metinos olefinicos), 4.2-3.6 (protones base oxígeno), 1.8-2.2 (metilenos) y 1.8-1.5 (metilos vinílicos *cis* y *trans*); el espectro de ^{13}C corroboró la presencia de las unidades de isopreno por las señales δ_{C} 141-130 y 127-123 que confirman enlaces dobles trisustituídos, además, confirmó la presencia de carbinoles por las señales a δ_{C} 61.4, 59.6 y 59.2. En contraste, el cromatograma de gases (cromatograma 1, anexo) presentó dos compuestos principales y sus espectros de masas sugieren la presencia de fitol y sitosterol.

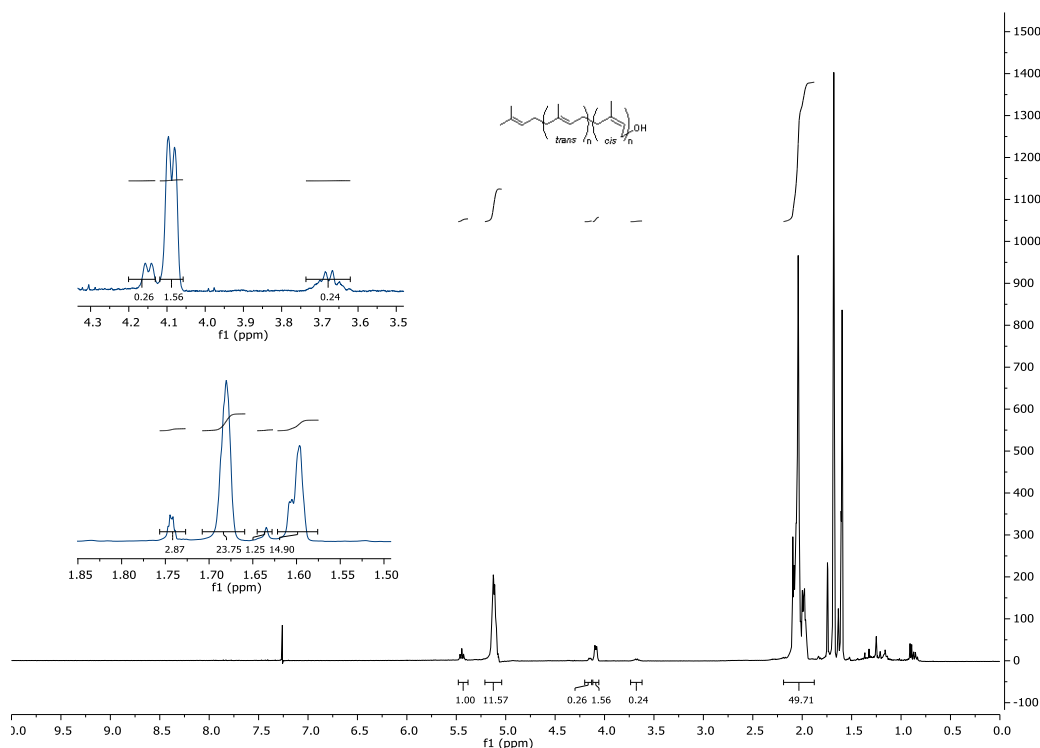


Figura 6.16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del extracto de hexano de las hojas de *T. hirsutissima* en negro y expansiones en azul.

Posteriormente, el extracto de hexano (H-Th) se fraccionó controlando este proceso evaluando el efecto de diferentes fracciones obtenidas en el modelo de inhibición de la producción de NO, antes empleado. Entonces, la cromatografía en columna del H-Th proporcionó seis fracciones primarias F1–F6. Debido a su mayor abundancia, solo se evaluaron en los macrófagos RAW 264.7 las fracciones F4 y F5. F4 inhibió la producción del NO con un efecto dependiente de la concentración ($\text{CI}_{50} = 36.5 \mu\text{g/mL}$) (Figura 6.14), su efecto fue aproximadamente tres veces menor que el observado para el extracto de H-Th ($\text{CI}_{50} = 11.2 \mu\text{g/mL}$). El efecto inhibitorio de F5 sobre la producción de NO, no se determinó debido a que esta fracción afectó la viabilidad celular de las células RAW 264.7 a partir de $15 \mu\text{g/mL}$ (Figura 6.15). Por lo tanto, F4 se fraccionó para producir cuatro subfracciones F4-1–F4-4, y los resultados mostraron que F4-2 fue la más activa con un $50.5 \pm 12\%$ de inhibición a $25 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$), seguido de la fracción F4-4 con una inhibición del $46.3 \pm 16.6\%$ a $100 \mu\text{g/mL}$. En contraste, F4-1 no inhibió significativamente la producción de NO (Figura

6.14). La fracción F4-3 no pudo ser evaluada, ya que su solubilidad fue muy baja. Entonces, la subfracción más activa (F4-2) se fraccionó para obtener F4-2-1 y F4-2-2. La fracción F4-2-1 se sometió a análisis mediante CG/EM indicando que el ftalato de bis (2-etilhexilo) fue el único componente principal en esta fracción. Por otro lado, F4-2-2 se analizó por CLAE a nivel analítico hasta encontrar las mejores condiciones para la separación de sus componentes (Figura 6.18). La separación por CLAE a nivel analítico se escaló a CLAE nivel preparativo con modificaciones menores permitiendo así la purificación de tres alcoholes poliisoprenoides. Estos compuestos fueron identificados mediante RMN y EM como (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**), (*Z*₈,*E*₃, ω)-dodecaprenol (**5**) y (*Z*₉,*E*₃, ω)-tridecaprenol (**6**). Cabe destacar que la obtención de los compuestos **4–6** a partir de *Tournefortia hirsutissima* se describe por primera vez en este trabajo.

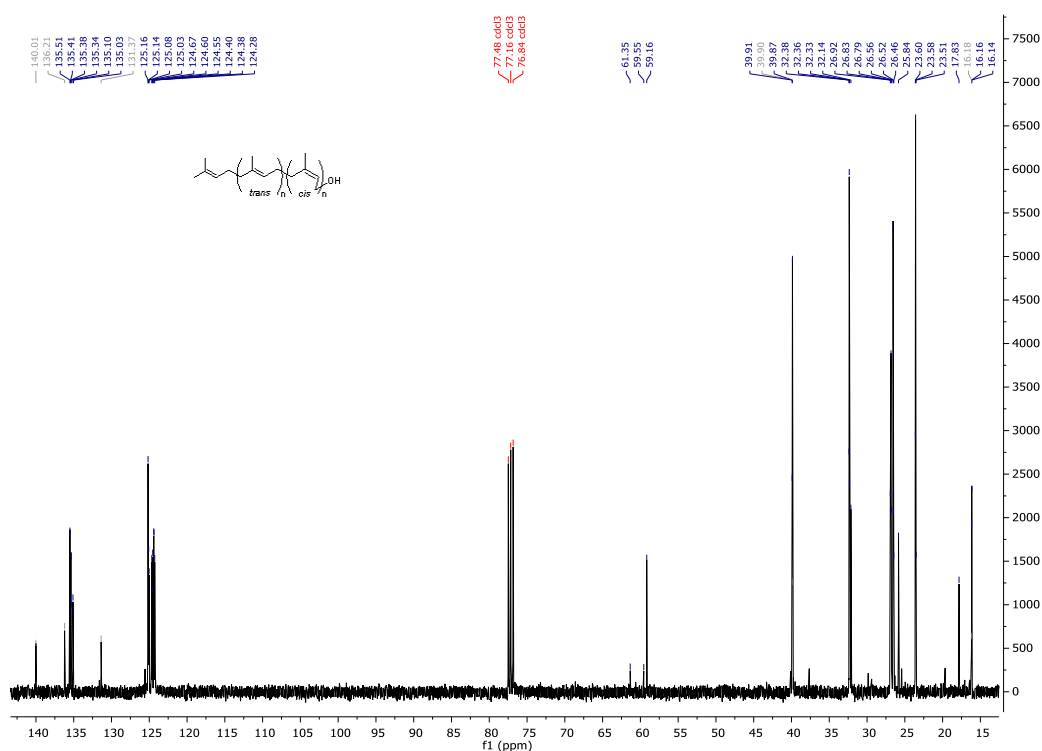


Figura 6.17. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del extracto de hexano de las hojas de *T. hirsutissima*.

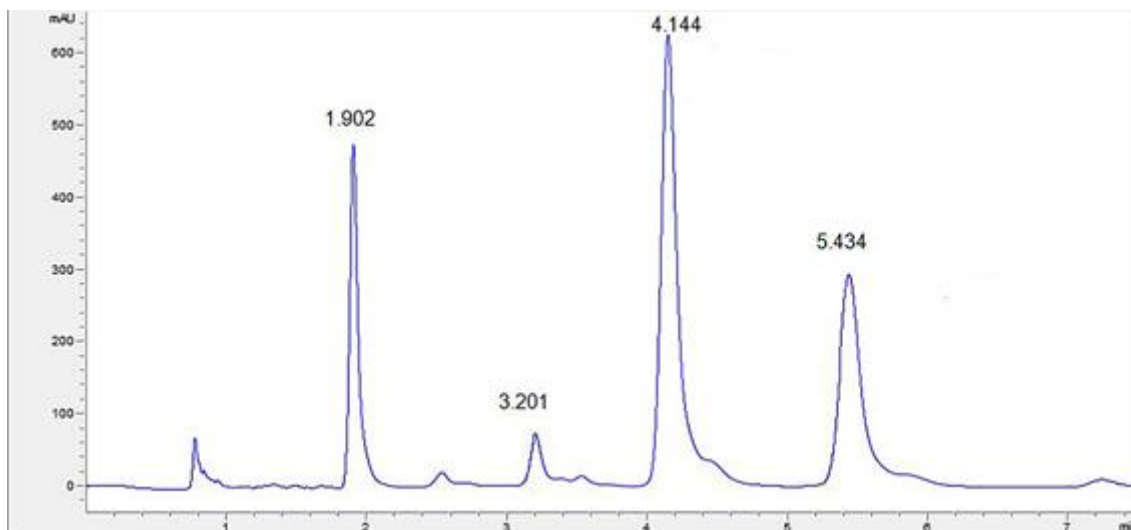


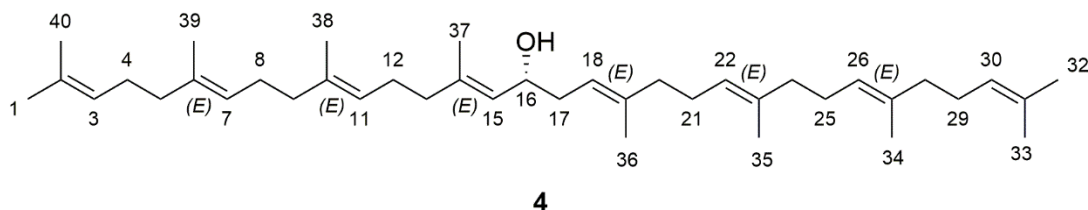
Figura 6.18 Cromatograma de F4-2-2 mediante CLAE a nivel analítico, monitoreado a 210 nm utilizando la columna Merck (Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm). La fase móvil consistió en un gradiente de iPrOH: MeOH: H₂O (30: 67: 03 a 30: 70: 00, v/v) durante 7.5 min a una velocidad de flujo de 2.0 mL/min. El volumen de inyección de la muestra fue de 7 μ L (1.5 mg/mL). Los picos con tiempos de retención de 1.90, 4.14 y 5.43 min corresponden a los compuestos poliisoprenoides **4**, **5** y **6**, respectivamente.

6.2.4 Caracterización de los alcoholes poliisoprenoides 4–6

La similitud de las unidades de prenilo en los poliprenoles causa amplia superposición de las señales en los espectros de RMN, lo que dificulta su caracterización. Sin embargo, ya se reportó la caracterización completa de tres poliprenoles debido al desarrollo de la RMN, y en dos de ellos, con la ayuda de reactivos que dispersan las señales (Misiak *et al.* 2010; Heseck *et al.* 2012; Lee *et al.* 2017). El uso de campos magnéticos de alta intensidad (600, 700 y 800 MHz), y de benceno- d_6 como disolvente mejoraron la resolución espectral y la dispersión de las señales, respectivamente. Heseck y col., y Lee y col. utilizaron el experimento 2D TOCSY, y este resultó ser imprescindible para la caracterización de (Z_4, E_2, ω)-heptaprenol y (Z_8, E_2, ω)-undecaprenol, respectivamente. Recientemente, el experimento 2D TOCSY también fue utilizado para la caracterización de las

unidades de prenilo de isómeros *cis/trans* de menaquinona-7 (Sitkowski *et al.* 2018). En estos estudios, el experimento TOCSY permitió asignar los protones de cada unidad de prenilo.

6.2.4.1 (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**)



El compuesto **4** se obtuvo como un aceite amarillo claro y su fórmula molecular se determinó como C₄₀H₆₆O mediante espectrometría de masas ESI/Q-TOF de alta resolución (m/z 563.5238 [M + H]⁺, calculado para C₄₀H₆₇O, 563.5186) (Figura 6.19).

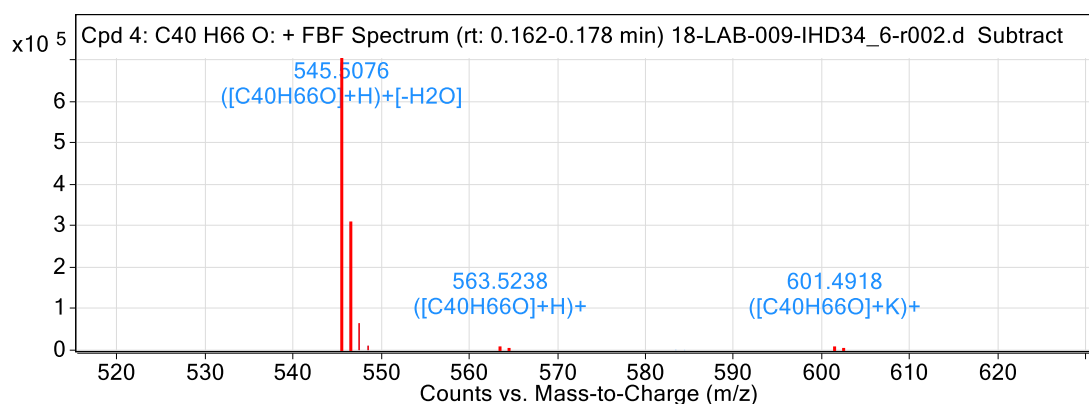


Figura 6.19. Expansión del espectro de masas ESI/Q-TOF de alta resolución correspondiente al compuesto (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**).

La resonancia de ^1H (Figura 6.20) reveló señales para ocho metinos olefínicos (δ_{H} 5.38-5.22 (8H, CH-3, -7, -11, -15, -18, -22, -26 y -30)), un metino hidroxilado (δ_{H} 4.39 (1H, CH-16)), trece metilenos (δ_{H} 2.04 (2H, CH₂-13), 2.26 y 2.40 (2H, CH₂-17), y entre 2.23-2.07 (22H, metilenos restantes)) y diez metilos vinílicos en δ_{H} 1.57 (6H, CH₃-33 y -40), 1.59 (3H, CH₃-37), 1.60 (6H, CH₃-35 y -38), 1.61 (3H, CH₃-36), 1.62 (6H, CH₃-34 y -39) y 1.69 (6H, CH₃-1 y -32). En conjunto, estos resultados sugieren una estructura tetraterpenoide acíclica, con un hidroxilo (-OH) enlazado a un carbono interno (un octaprenol), y no en el carbono terminal (C-1) de la unidad α como en poliprenoles más comunes.

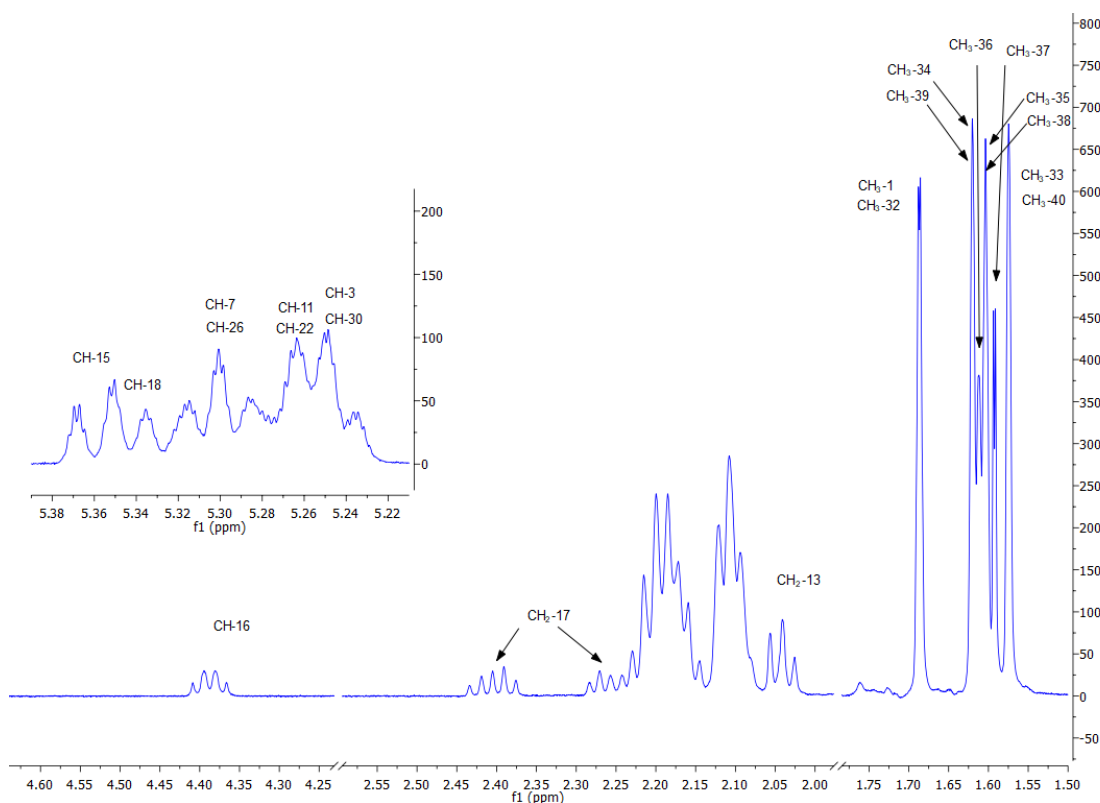


Figura 6.20. Expansiones del espectro de RMN ^1H (500 MHz, benceno- d_6) del compuesto (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**).

El espectro de RMN DEPTQ del compuesto **4** (Figura 6.21) presentó señales de ^{13}C para ocho enlaces dobles trisustituídos ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$) entre δ_{C} 130-120 ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\underline{\text{C}}\text{HR}$, C-3, -7, -11, -15, -18, -22, -26 y -30), y entre δ_{C} 138-131

(R1R2C=CHR, C-2, -6, -10, -14, -19, -23, -27 y -31), corroborando ocho unidades de prenilo. Además, la señal en δ_c 68.62 (C-16) corroboró la presencia de un grupo carbinol. Las señales a δ_c 16.8, 16.5 y 16.2 corresponden a los metilos vinílicos C-34, -35, -36, -37, -38 y -39, que, de acuerdo a los desplazamientos químicos se asignan a seis unidades de prenilo internas con configuración *E*: los desplazamientos químicos de los metilos vinílicos son influenciados por la estereoquímica, y se desplazan a campo más bajo en las unidades de prenilo con configuración *Z* con valores δ_c alrededor de 24 en comparación a los metilos de las unidades de prenilo con configuración *E* con valores δ_c alrededor de 16.2 (Lee *et al.* 2017).

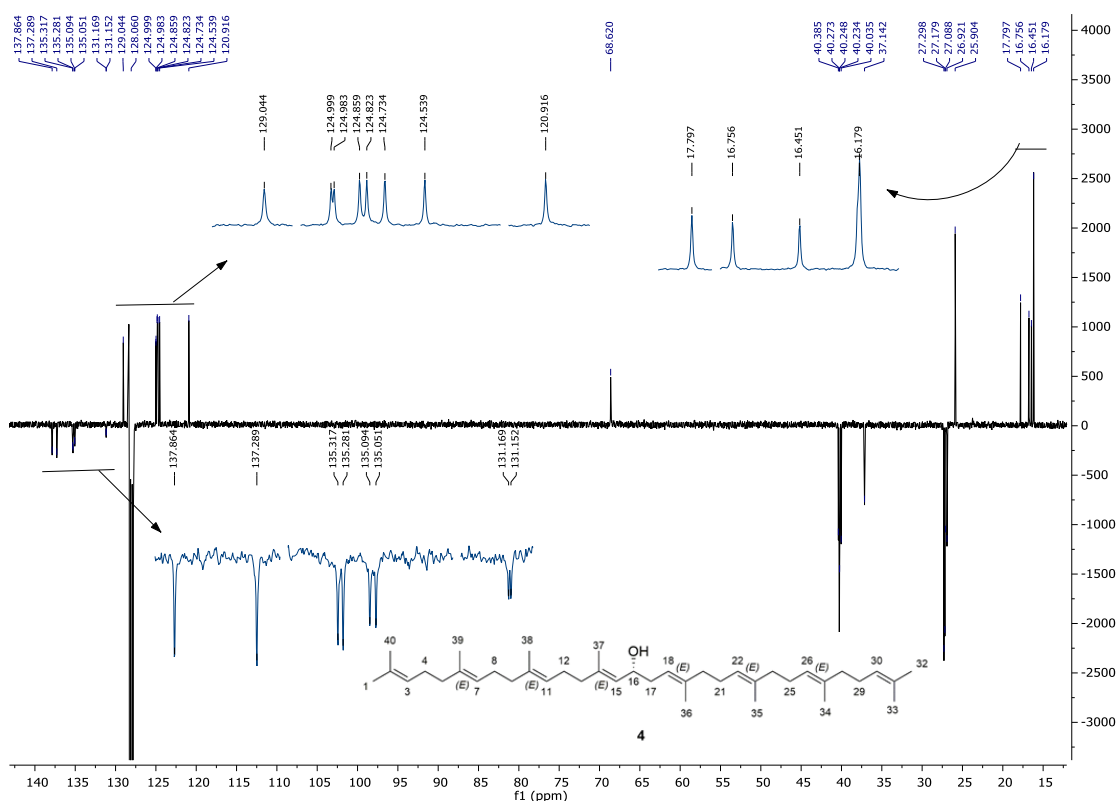


Figura 6.21. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, benceno- d_6) del compuesto (*R*)-16-hidroxi-liposeno (**4**) en negro y sus expansiones de las regiones de los carbonos sp^2 y de metilos vinílicos en azul.

La asignación de los desplazamientos químicos de 1H y ^{13}C (ver, Tabla 6.2) del compuesto **4** se realizó a partir del análisis de los espectros homonucleares (COSY,

TOCSY) y heteronucleares (HSQC, HMBC). Las conectividades de ^1H se establecieron mediante los espectros COSY y TOCSY. El espectro HSQC dio las conectividades ^1H - ^{13}C a un enlace. Y finalmente, con el espectro HMBC a través de las correlaciones ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces, se asignaron los carbonos cuaternarios, la señal para el metileno C-12 y los carbonos de los metilos C-35, C-36, C-37 y C-38. Además, se corroboraron asignaciones de ^{13}C previamente establecidas y se establecieron las conexiones prenilo-prenilo.

Tabla 6.2 Datos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C * (126 MHz) del compuesto **4** en C_6D_6 .

Posición	δ_{H}	δ_{C}	HMBC**	Posición	δ_{H}	δ_{C}	HMBC**
CH ₃ -1	1.69	25.89	C-2, C-3, C-40	CH ₂ -21	2.21-2.16	27.08	
C-2		131.15 ^a		CH-22	5.26	124.73	
CH-3	5.25	125.00 ^b	C-1, C-40	C-23		135.22 ^e	
CH ₂ -4	2.22-2.16	27.29 ^c		CH ₂ -24	2.12	40.27 ^d	
CH ₂ -5	2.12 - 2.08	40.27 ^d		CH ₂ -25	2.23-2.15	27.18 ^g	
C-6		135.05 ^e		CH-26	5.30	124.82 ^f	
CH-7	5.30	124.86 ^f	C-5, C-8, C-9	C-27		135.28 ^e	
CH ₂ -8	2.23-2.15	27.30 ^g		CH ₂ -28	2.12-2.08	40.38 ^d	
CH ₂ -9	2.12-2.08	40.23 ^d		CH ₂ -29	2.22-2.16	27.17 ^c	
C-10		135.09 ^e		CH-30	5.25	124.98 ^b	C-32, C-33
CH-11	5.26	124.54	C-12, C-13, C-38	C-31		131.17 ^a	
CH ₂ -12	2.19-2.15	26.91		CH ₃ -32	1.69	25.89	C-30, C-31, C-33
CH ₂ -13	2.04	40.03	C-11, C-12, C-14, C-15, C-37	CH ₃ -33	1.57	17.78	C-30, C-31, C-32
C-14		137.29		CH ₃ -34	1.62	16.45 ^h	
CH-15	5.36	129.04		CH ₃ -35	1.60	16.18 ^h	
CH-16	4.39	68.62	C-14, C-15, C-16, C-17	CH ₃ -36	1.61	16.76	C-18, C-19
CH ₂ -17	2.40, 2.26	37.13	C-15, C-16, C-18, C-19	CH ₃ -37	1.59	16.76	C-14, C-15
CH-18	5.34	120.92		CH ₃ -38	1.60	16.18 ^h	C-10
C-19		137.87		CH ₃ -39	1.62	16.45 ^h	C-6
CH ₂ -20	2.11-2.09	40.25 ^d		CH ₃ -40	1.57	17.78	C-1, C-2, C-3

* Las resonancias de ^{13}C se obtuvieron mediante el experimento DEPTQ. ** Correlaciones HMBC claves, a partir de la posición del ^1H indicado a los átomos de ^{13}C indicados. ^{a, b, c, d, e, f, g, h} Los valores de las resonancias con las mismas letras podrían ser intercambiables entre ellos, debido a que no se pueden establecer de forma inequívoca debido a la superposición entre las correlaciones en los espectros HSQC y HMBC.

A continuación, se presenta el análisis del espectro COSY (Figura 6.22): la identidad de las resonancias δ_H 5.36 (H-15), 2.40 y 2.26 (H-17) se estableció por sus correlaciones con la señal a δ_H 4.39 (H-16) (ver, Figuras 6.22 A) y B), respectivamente). H-15 en δ_H 5.36 presentó correlaciones con las resonancias en δ_H 2.04 (H-13) y 1.59 (H-37), mientras que las resonancias para H-17 en δ_H 2.26 y 2.40 presentaron correlación con H-18 (δ_H 5.34) (Figura 6.22 C). Además, con el espectro COSY, fue posible identificar las correlaciones de los protones metilos en δ_H 1.60 (H-38 y H-35) y 1.62 (H-34 y H-39) con las señales de metinos olefinicos en δ_H 5.26 (H-11 y H-22) y 5.30 (H-7, H-26), respectivamente.

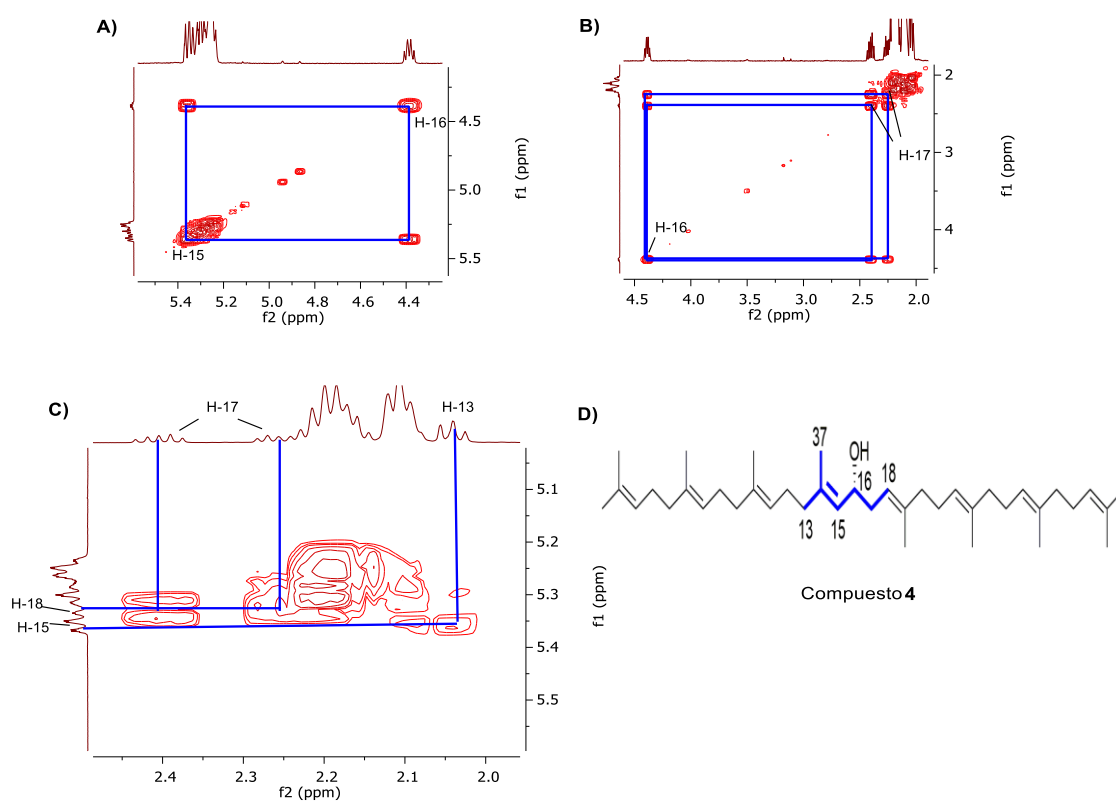


Figura 6.22. Expansiones del espectro COSY de (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**): asignación de los protones H-13, H-15, H-16, H-17, H-18 y H-37. A) y B), correlaciones H-16 con H-15 y H-16 con H-17, respectivamente. C) correlaciones H-17 con H-18 y H-15 con H-13. D) compuesto **4** representando las asignaciones establecidas por COSY en azul.

Con el espectro TOCSY se asignaron las señales de ^1H de cada unidad de prenilo. A continuación, se describe su análisis y se ejemplifica en la Figura 6.23: las resonancias de las unidades de prenilo terminales (coloreadas en verde en la Figura 6.23 C)) se asignaron a partir de la identificación de los metilos terminales por la correlación H-1 y H-32 (δ_{H} 1.69) con H-40 y H-33 (δ_{H} 1.57), respectivamente (ver, Figura 6.23 A)). Las resonancias H-1 (δ_{H} 1.69) y H-40 (δ_{H} , 1.57) presentaron correlaciones con H-3 (δ_{H} 5.25), H-4, (δ_{H} 2.22-2.16) y H-5 (δ_{H} 2.12-2.08), de igual manera, las resonancias H-32 (δ_{H} 1.69) y H-33 (δ_{H} 1.57) presentaron correlaciones con H-30 (δ_{H} 5.25) H-29 (δ_{H} 2.22-2.16) y H-28 (2.12-2.08); la resonancia característica del protón base oxígeno, H-16 (δ_{H} 4.39), fue el punto de partida para identificar los protones de las dos unidades de prenilo internas, coloreadas en rosa en la Figura 6.23 C). H-16 (δ_{H} 4.39) presenta correlaciones con H-12 (δ_{H} 2.19-2.15), H-13 (δ_{H} 2.04), H-15 (δ_{H} 5.36), H-17 (δ_{H} 2.26 y 2.40), H-18 (δ_{H} 5.34), H-20 (δ_{H} 2.11-2.09), H-36 (δ_{H} 1.61) y H-37 (δ_{H} 1.59) (Figura 6.23 A)); la señal a δ_{H} 5.26 se asignó al protón olefinico H-11 por su correlación con H-13 (δ_{H} 2.04). Además, H-11 (δ_{H} 5.26) presentó correlaciones con los protones H-9 (δ_{H} 2.12-2.08), H-12 (δ_{H} 2.19 a 2.15) y H-38 (δ_{H} 1.60) (coloreados en azul en la Figura 6.23 C)) (ver, Figura 6.23 B)).

El espectro HSQC presentó amplia superposición de las correlaciones ^1H - ^{13}C . Sin embargo, con este se lograron establecer diez resonancias de ^{13}C . A continuación, se describen algunas correlaciones y se ilustran en la Figura 6.24: la señal de ^1H a δ_{H} 4.39 (H-16) correlacionó con la señal de carbono adyacente a δ_{C} 68.62; las señales de protón H-15 (δ_{H} 5.36) y H-18 (δ_{H} 5.34) correlacionaron con los carbonos a δ_{C} 129.04 y 120.92, respectivamente; la señal a δ_{H} 1.69 correspondiente a los metilos H-1 y H-32 en configuración *Z* presentó una correlación con el ^{13}C a δ_{C} 25.89; la señal a δ_{H} 1.57 correspondiente a los metilos H-33 y H-40 en configuración *E* presentó una correlación con el ^{13}C a δ_{C} 17.78 (Figura 6.24 C).

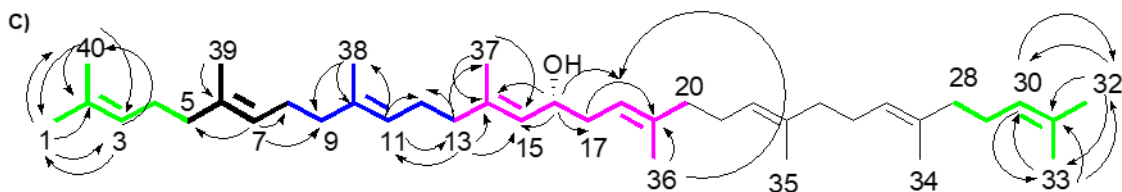
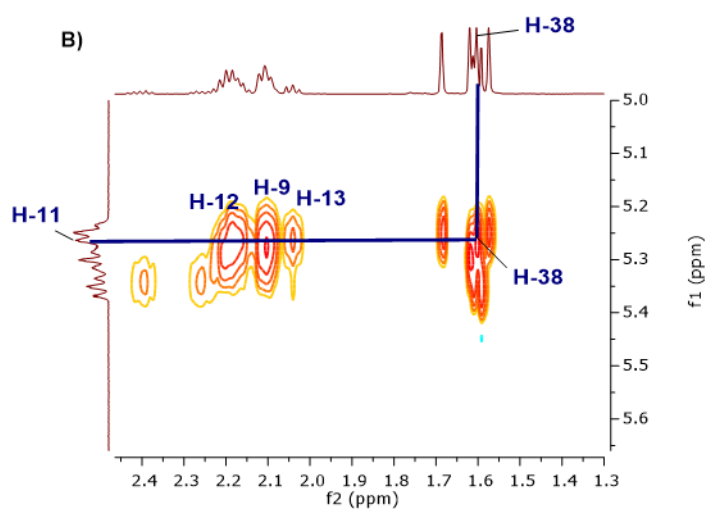
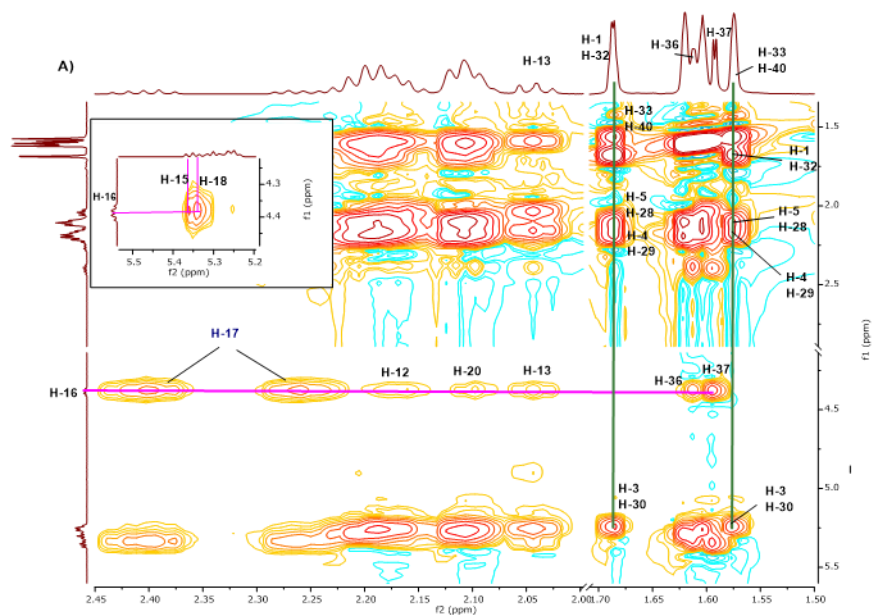


Figura 6.23. Asignaciones de RMN ^1H de (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**) (coloreado en C)). A) y B) expansiones del espectro TOCSY: A), correlaciones de los protones en rosa y verde en C), y B), correlaciones de los protones en azul en C). Las flechas en C), representan correlaciones HMBC ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces.

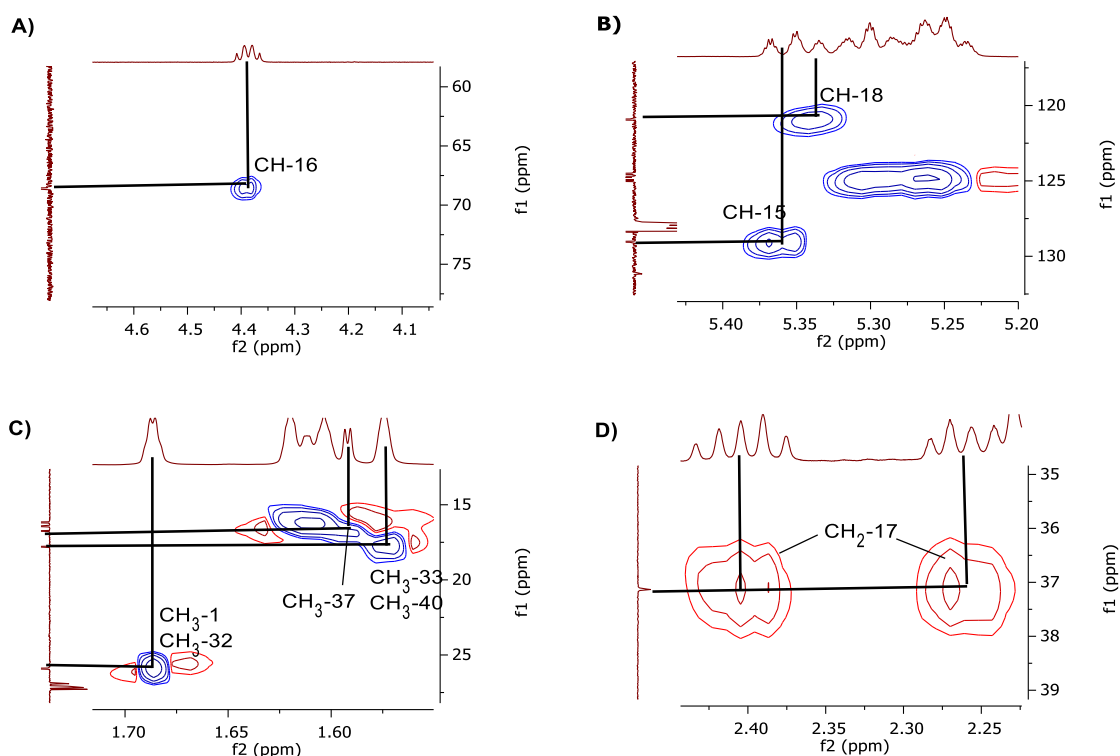


Figura 6.24. Expansiones del espectro HSQC de (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**). A) correlación del protón base oxígeno H-16 con C-16 (δ_c 68.62). B) correlaciones H-15 y H-18 con C-15 (δ_c 129.04) y C-18 (δ_c 120.92), respectivamente. C) correlaciones H-1 y H-32 con C-1 y C-32 (δ_c 25.89), respectivamente; correlaciones H-33 y H-40 con C-33 y C-40 (δ_c 17.78), respectivamente; correlación H-37 con C-37 (δ_c 16.76). D) correlaciones de los protones H-17 con C-17 (δ_c 37.13).

El análisis del espectro HMBC se ejemplifica a continuación (ver las correlaciones clave en la Tabla 6.2 y la representación de las correlaciones en la Figura 6.23 C)): la resonancia del protón base oxígeno a δ_H 4.39 (H-16) presentó correlaciones con las señales a δ_c 137.29, 129.04, 120.92 y 37.13 (Figura 6.25 A)). La señal a δ_c 137.29 se asignó al C-14 por ser la única señal de carbono cuaternario. Las tres señales restantes ya se habían asignado previamente mediante el uso del espectro HSQC para C-15 (δ_c 129.04), C-18 (δ_c 120.92) y C-17 (δ_c 37.13). Estas correlaciones establecen la conectividad entre las unidades de prenilo 4 y 5 (ver, Figura 6.26) y un enlace cabeza a cabeza entre C-16 y C-17; las señales a δ_H

1.69 (H-1 y H-32) y δ_H 1.57 (H-33 y H-40) presentaron correlaciones con los carbonos a δ_C 131.17, 131.15, 125.00 y 124.98 (Figura 6.25 B)). Por lo tanto, las señales de carbono cuaternario a δ_C 131.17 y 131.15 fueron asignadas a C-2 o C-31, y las señales de carbono olefinico protonado δ_C 125 y 124.98 fueron asignadas a C-3 o C-30. Estas señales no pudieron asignarse inequívocamente debido a su pequeña diferencia de desplazamiento químico (0.02 δ).

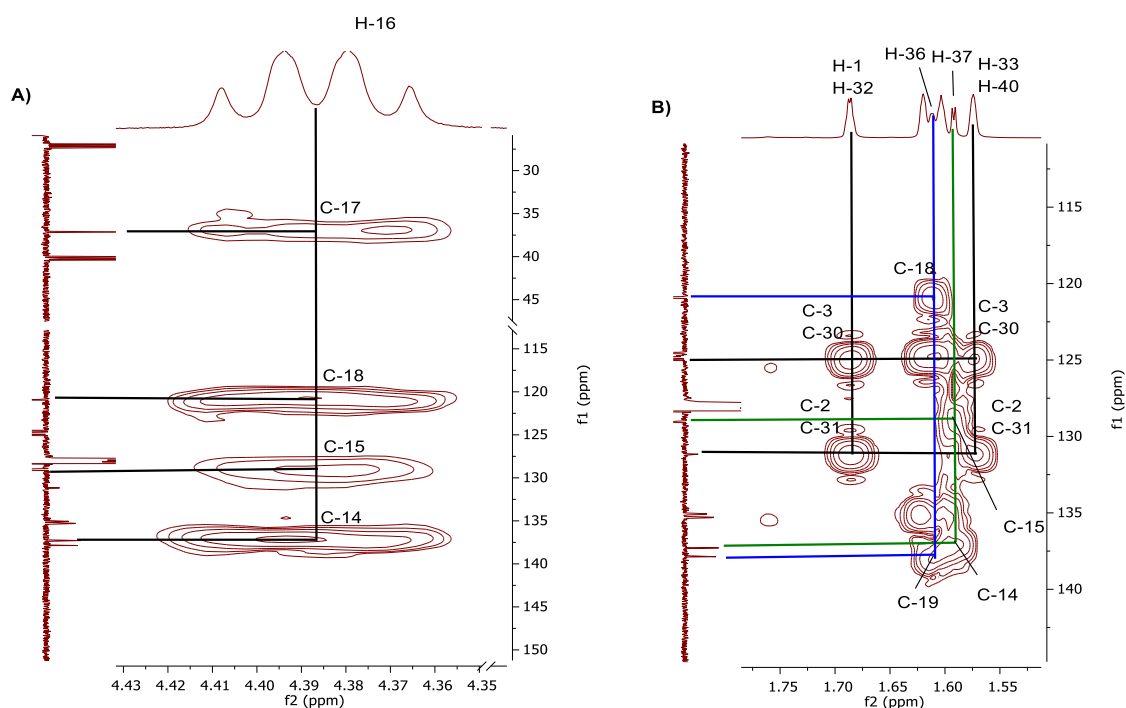


Figura 6.25. Expansiones del espectro HMBC de (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**). A) correlaciones H-16 – C-14, H-16 – C-15, H-16 – C-17 y H-16 – C-18. B) correlaciones de los protones metilo con los carbonos del doble enlace de su unidad de prenilo correspondiente.

Finalmente es importante mencionar que, la posición del hidroxilo (–OH) en C-16 causa que las resonancias de protón de las unidades de prenilo internas (4 y 5 en la Figura 6.26) se puedan diferenciar (los desplazamientos químicos para los protones del compuesto **4** se presentan en la Tabla 6.2). Sin embargo, esto no fue posible para todas las unidades de prenilo, presentando traslape las resonancias de los metilos de las unidades de prenilo 1 con 8, 2 con 7, y 3 con 6 (Figura 6.26). La

región de los metilenos fue la de mayor superposición; las señales de los metilenos adyacentes al carbono olefinico protonado (CH₂-4, CH₂-8, CH₂-12, CH₂-21, CH₂-25 y CH₂-29) en δ_H 2.23-2.15 y de los metilenos adyacentes al carbono olefinico no protonado (CH₂-5, CH₂-9, CH₂-20, CH₂-24 y CH₂-28) en δ_H 2.12-2.08.

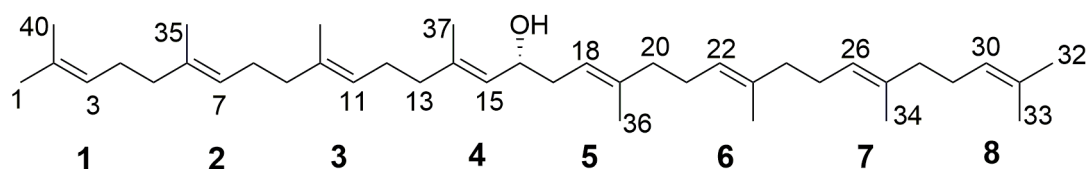


Figura 6.26. Estructura del compuesto (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**) representando las ocho unidades de prenilo.

El compuesto **4** solo se había aislado y caracterizado a partir de la planta acuática *Myriophyllum verticillatum* (Lanzetta *et al.* 1988); sin embargo, los datos de RMN que se proporcionaron fueron limitados (por ejemplo, solo se reportaron once resonancias de ¹³C). Además, no se determinó la configuración absoluta. En este trabajo se determinó la configuración absoluta por el método de Mosher. Este método es adecuado para alcoholes secundarios (R¹R²CHOH) o aminas α -quirales (R¹R²CHNH₂), y, consiste en la formación de dos ésteres diastereómeros (*R* o *S,S* y *R* o *S,R*) a partir de un compuesto con configuración desconocida y los ácidos de Mosher (o sus respectivos cloruros de ácido) que son enantiómeros *S* y *R* del ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético (*S* o *R*-MTPA por sus siglas en inglés). Dale y Mosher reconocieron que los diastereómeros tienen propiedades físicas y espectroscópicas diferentes, así sus espectros de RMN ¹H serían diferentes (Hoye *et al.* 2007). El análisis de esta diferencia en términos del efecto anisotrópico permite finalmente, determinar la configuración absoluta.

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de los ésteres de Mosher a partir del compuesto **4** de configuración desconocida y los cloruros de ácido *R* y *S*, respectivamente (Figura 6.27 a)). Esto resultó en la formación de dos ésteres de Mosher diastereómeros, *S* (**4a**) y *R* (**4b**). Posteriormente, se adquirieron los espectros de RMN de ¹H, COSY y HMBC de **4a** y **4b** para identificar los desplazamientos químicos de los protones cercanos al centro estereogénico.

Específicamente, se identificaron las posiciones CH-15 (R^2), CH₂-17, CH-18 y CH₃-36 (R^1) (Figura 6.27 b)). La comparación de los desplazamientos químicos de estas posiciones en ambos diastereómeros permite deducir la configuración absoluta del compuesto bajo investigación. Para ello, se calcula $\Delta\delta^{S-R}$ definido como, $\Delta\delta^{S-R} = \delta_H S$ (**4a**) - $\delta_H R$ (**4b**). Basándonos en los valores $\Delta\delta^{S-R}$, y el modelo de la Figura 6.27 c), la configuración absoluta de C-16 se asignó como *R*.

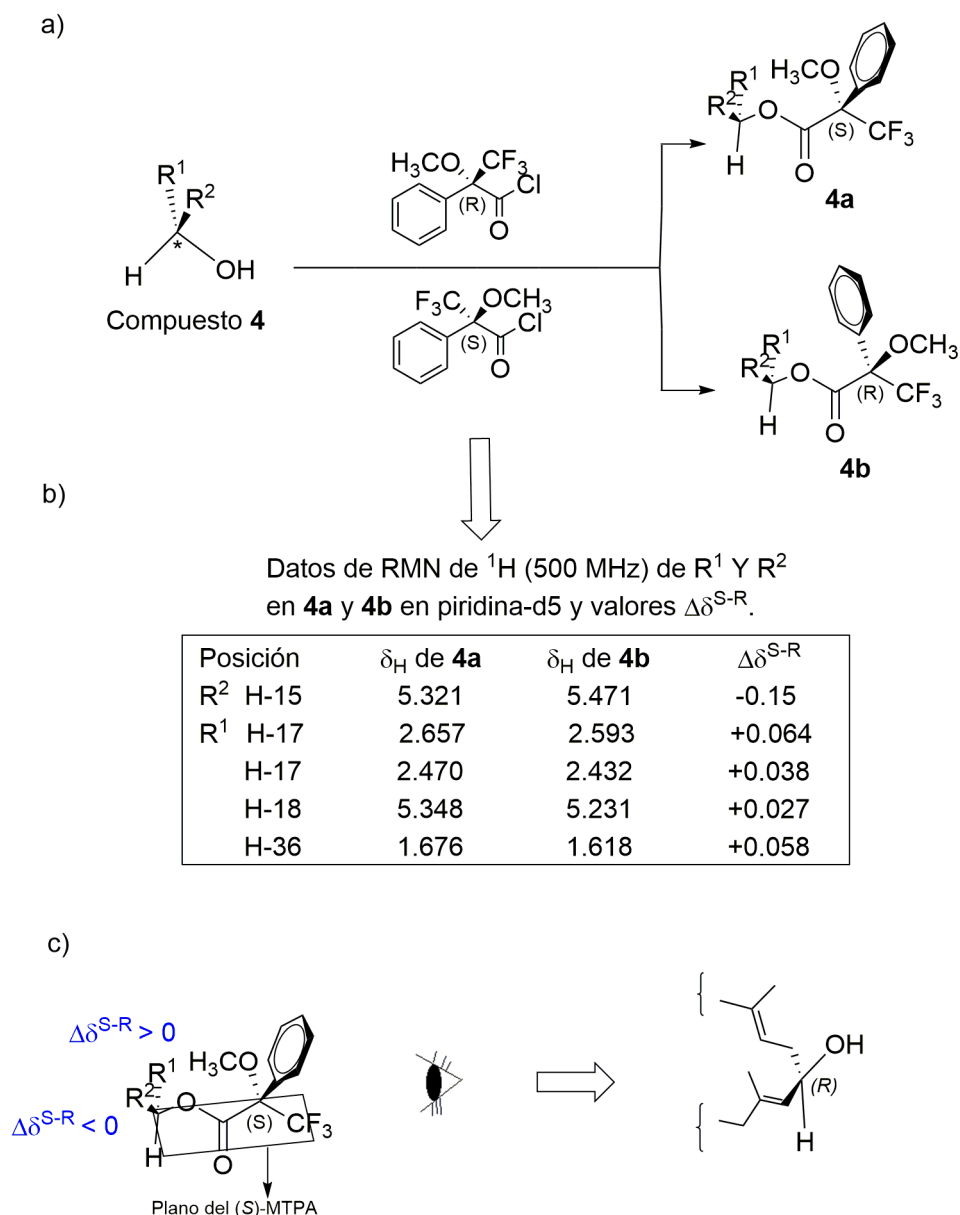
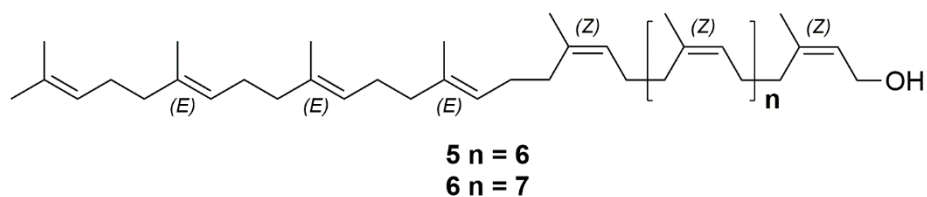


Figura 6.27. Pasos experimentales y modelo para determinar la configuración absoluta del compuesto **4**. a) preparación de los ésteres de Mosher, b) valores δ_H y $\Delta\delta^{S-R}$ para las posiciones H-15, H-17, H-18 y H-36 de los ésteres **4a** y **4b** y c) modelo para el cálculo de la configuración absoluta.

De acuerdo con los datos anteriores, la estructura del compuesto **4** se caracterizó como (*R*)-(6*E*,10*E*,14*E*,18*E*,22*E*,26*E*)-2,6,10,14,19,23,27,31-octametildriaconta-2,6,10,14,18,22,26,30-octaen-16-ol.

6.2.4.2 (*Z*₈,*E*₃, ω)-dodecaprenol (**5**) y (*Z*₉,*E*₃, ω)-tridecaprenol (**6**)



El espectro de masas ESI/Q-TOF del compuesto **5** (espectro 12, ver anexo) presentó un ión pseudomolecular a m/z 852.7942 $[M + NH_4]^+$ (calculado para $C_{60}H_{102}NO$, m/z 852.7961) correspondiente con la fórmula molecular $C_{60}H_{98}O$. Con este dato y el análisis del espectro de RMN 1H el compuesto **5** se identificó como (*Z*₈,*E*₃, ω)-dodecaprenol. A continuación, se presenta el análisis del espectro de 1H (espectro 13, ver anexo); el espectro de 1H presentó una señal a δ_H 5.45 correspondiente al protón metino de la unidad de prenilo que lleva el hidroxilo. Además, entre δ_H 5.17 a 5.06 señales de protón metino que integran para once protones. Por lo tanto, este compuesto resultó ser un dodecaprenol. En δ_H 4.09 una señal doble correspondiente a los protones del metileno base oxígeno. Entre δ_H 2.14 a 1.94 las señales de los metilenos restantes, y finalmente señales de metilos vinílicos a δ_H 1.75 (1 CH_3 (*Z*)), δ_H 1.70-1.67 (8 CH_3 (*Z*)) y δ_H 1.62-1.59 (4 CH_3 (*E*)). Se establece que las tres unidades de prenilo en configuración *E*, se encuentran al final de la cadena terminal contraria a la del hidroxilo es decir una secuencia $\omega, E_3 Z_8$, de acuerdo a lo encontrado en la naturaleza: poliprenoles tri-*trans*-poli-*cis* en poliprenoles con 9-15 unidades de prenilo y di-*trans*-poli-*cis* en poliprenoles con más de 15 unidades de prenilo (Skorupinska *et al.* 2007). El compuesto **6** se analizó por espectrometría de masas ESI/Q-TOF (espectro 16, ver anexo), presentando un ión pseudomolecular a m/z 920.8548 $[M + NH_4]^+$ calculado para $C_{65}H_{110}NO$, m/z 920.8587 y correspondiente con la fórmula molecular $C_{65}H_{106}O$. Su espectro de 1H (espectro 15, ver anexo) presento las mismas características que el del compuesto

5, diferenciándose únicamente en su integración, dando una unidad de prenilo adicional lo que coincide con la masa molecular.

Los datos de RMN de ^1H de los compuestos **5** y **6** coincidieron con los reportados en la literatura para (Z_8, E_3, ω)-dodecaprenol (**5**) (Lanzetta et al. 1988; Monaco et al. 1983) y (Z_9, E_3, ω)-tridecaprenol (**6**) (Lanzetta et al. 1988).

6.2.5 Actividad antiinflamatoria de los alcoholes poliisoprenoides (4–6)

Los compuestos **4–6** se evaluaron en las células RAW 264.7 estimuladas con LPS para su inhibición de la producción de NO. El compuesto **4** disminuyó la viabilidad celular a 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6.28 A)). Por lo tanto, **4** se evaluó abajo de su concentración no tóxica más alta. El compuesto **4** presentó una actividad inhibitoria moderada dependiente de la concentración, a 14.4 $\mu\text{g/mL}$ (25.6 μM) inhibió la producción de NO en $28.55 \pm 1.81\%$ (Figura 6.28 B)). En contraste, los compuestos **5** y **6** no afectaron la viabilidad celular. Sin embargo, presentaron una actividad inhibitoria despreciable a la concentración más alta evaluada (60 $\mu\text{g/mL}$).

En la inflamación, el óxido nítrico (NO) es sintetizado por la enzima iNOS, mientras que la enzima iNOS puede ser estimulada de manera persistente por las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β (Lechner *et al.* 2005; Lu *et al.* 2006). Recientemente, se demostró que el solanesol (40 μM), un poliprenol todo *trans* con nueve unidades de isopreno, suprime la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α (Yao *et al.* 2017). Esto lleva a suponer que el compuesto **4** tiene efecto inhibitorio en la producción de citocinas proinflamatorias.

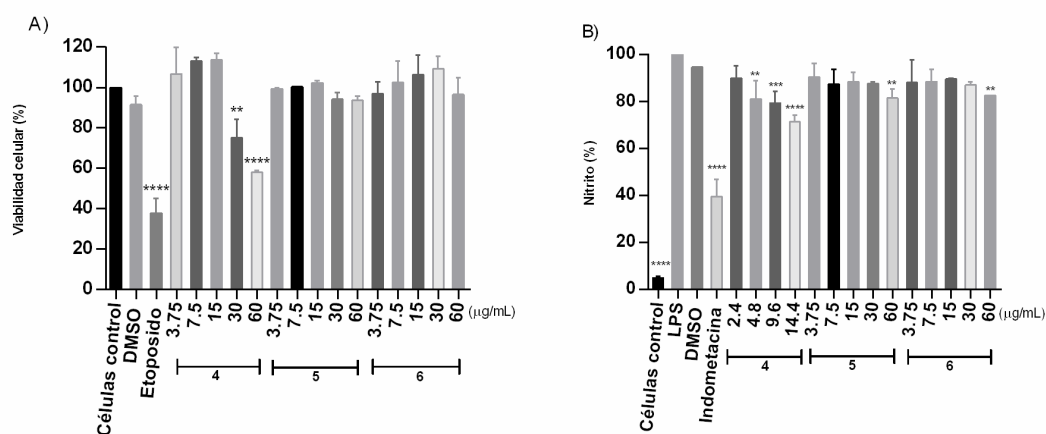


Figura 6.28. A) Efecto de los compuestos 4–6 a las concentraciones de 3.75, 7.5, 15, 30 y 60 µg/mL, sobre la viabilidad celular de células RAW 264.7 mediante un ensayo de MTS. La viabilidad celular se expresa en porcentaje. B) Inhibición de la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS por los compuestos 4 a 2.4, 4.8, 9.6 y 14.4 µg/mL y 5–6 a 3.75, 7.5, 15, 30 y 60 µg/mL. Las células se trataron con 4–6, DMSO (0,4%, v/v) o indometacina (30 µg/mL) 2 h antes de la estimulación con LPS (1.0 µg/mL). El nitrito se determinó por el método de Griess y se expresa en porcentaje. Todos los datos representan la media ± D.E. de al menos tres experimentos independientes cada uno por triplicado. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ en comparación con las células control (sin tratamiento) en A) y con el grupo LPS en B).

6.2.6 Actividad antiproliferativa de los alcoholes poliisoprenoides (4–6)

La actividad antiproliferativa de los compuestos 4–6 se evaluó contra cuatro líneas celulares de cáncer humano (HeLa, PC3, HepG2 y Hep3B) y en la línea IHH no cancerosa. Los resultados se resumen en la Tabla 3. El compuesto 4 tuvo el mayor efecto antiproliferativo en las cuatro líneas celulares de cáncer con valores de Cl_{50} entre $21.3 \pm 3.5 - 37.3 \pm 3.5 \mu M$, siendo más activo en las líneas celulares de cáncer hepatocelular con valores de Cl_{50} de, $21.3 \pm 3.5 \mu M$ en Hep3B y $26.6 \pm 3.5 \mu M$ en HepG2. En las células IHH, el compuesto 4 presentó actividad antiproliferativa

con un valor de CI_{50} de $88.8 \pm 8.9 \mu\text{M}$. Por lo tanto, el compuesto **4** exhibe selectividad hacia Hep3B y HepG2. En lo que respecta a los compuestos **5** y **6**, estos presentaron una actividad antiproliferativa contra las cuatro líneas celulares de cáncer y las células IHH en el rango de CI_{50} entre $50.3 \pm 5.9 - 95.7 \pm 12.0 \mu\text{M}$.

Tabla 6.3 Valores CI_{50} en μM de **4–6** contra 4 líneas celulares de cáncer y una no cancerosa (IHH).

Comp.	HeLa	PC3	HepG2	Hep3B	IHH
4	37.3 ± 3.5	32.0 ± 4.4	26.6 ± 3.5	21.3 ± 3.5	88.8 ± 8.9
5	95.7 ± 12.0	74.2 ± 5.0	76.6 ± 6.0	50.3 ± 5.9	76.6 ± 6.0
6	84.1 ± 8.9	76.4 ± 6.6	74.2 ± 5.5	69.7 ± 5.5	74.1 ± 5.5
PTX	0.01 ± 0.002^a	0.0154 ± 0.003^a	0.0065 ± 0.0007^a	0.008 ± 0.001^a	0.08 ± 0.005^a

^a CI_{50} del control positivo paclitaxel (PTX) en μM .

6.2.7 Actividad apoptótica de (*R*)-16-hidroxi-licoperseno

Dado que el compuesto **4** tuvo la mayor actividad antiproliferativa contra las cuatro líneas celulares de cáncer, se examinó su efecto sobre la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 6.29). Se utilizó paclitaxel (PTX) como control de la detención de la fase G_2/M . El tratamiento del compuesto **4** a su CI_{50} aumentó la población en sub- G_1 en las células Hep3B [de 0.0 a 18.5%, Figura 6.29 A)], HepG2 [de 1.5 a 14.8%, Figura 6.29 B)] y PC3 [de 0.9 a 19.0%, Figura 6.29 C)]. El aumento en la fase sub- G_1 del ciclo celular con respecto a las células de control se asocia con un menor contenido de ADN, lo que sugiere la muerte celular. Además, algunas investigaciones describen una correlación entre la muerte apoptótica inducida por compuestos químicos y un aumento en la fase sub- G_1 del ciclo celular (Ormerod *et al.* 1992; Liang *et al.* 2012; Lee *et al.* 2015). Por lo tanto, se procedió a caracterizar el tipo de muerte celular inducida por el compuesto **4** en las células Hep3B, ya que fue la línea celular más sensible de acuerdo con la CI_{50} .

Se determinó si la muerte celular inducida por el compuesto **4** fue causada por apoptosis o necrosis. La externalización de la fosfatidilserina, un marcador de la

apoptosis de fase temprana se analizó mediante la tinción con Anexina V y ioduro de propidio (IP), y la citometría de flujo (Figura 6.30). Los resultados indicaron que el porcentaje de células de apoptosis en fase temprana aumentó 22.6% después del tratamiento con el compuesto **4** y 38% con PTX (control positivo de apoptosis), lo que demuestra que el compuesto **4** induce apoptosis de las células Hep3B.

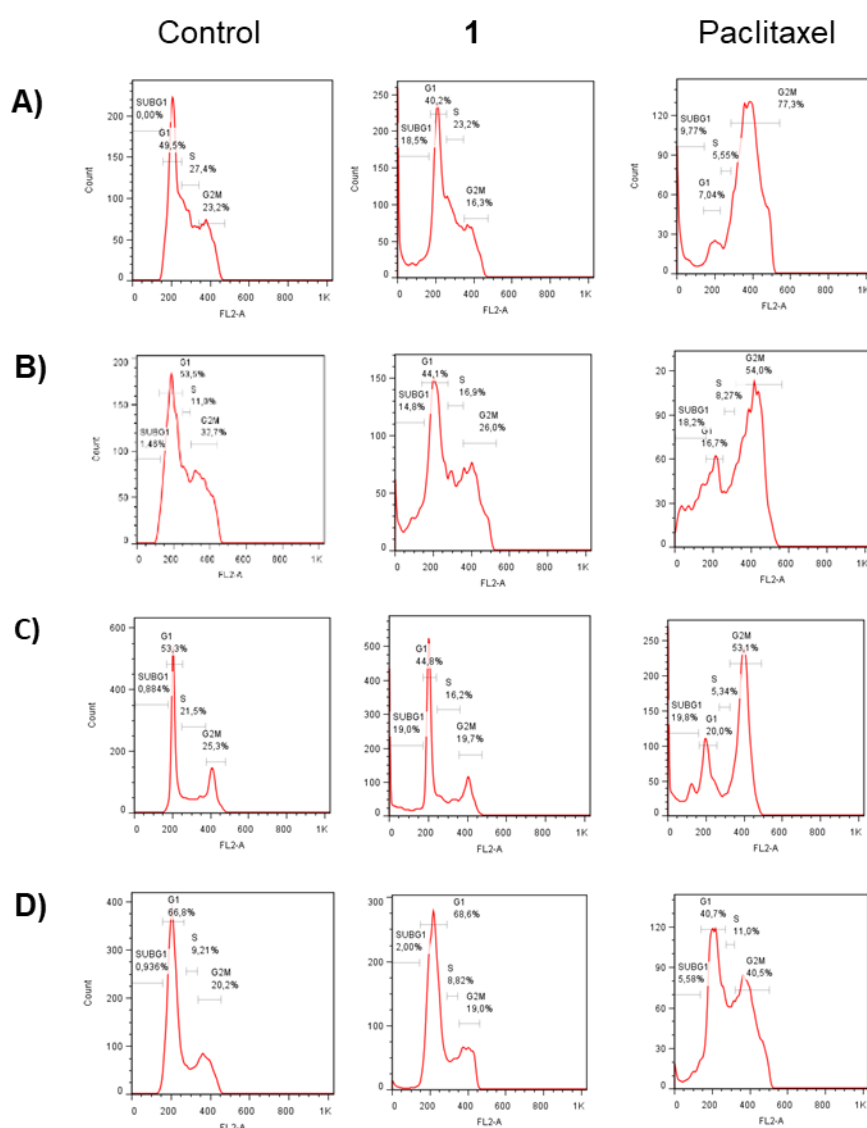


Figura 6.29. Ciclo celular de las células Hep3B (A), HepG2 (B), PC3 (C) y HeLa (D) mediante citometría de flujo después del tratamiento con el compuesto **4** a su CI_{50} durante 72 h y Paclitaxel (PTX) a 10 nM.

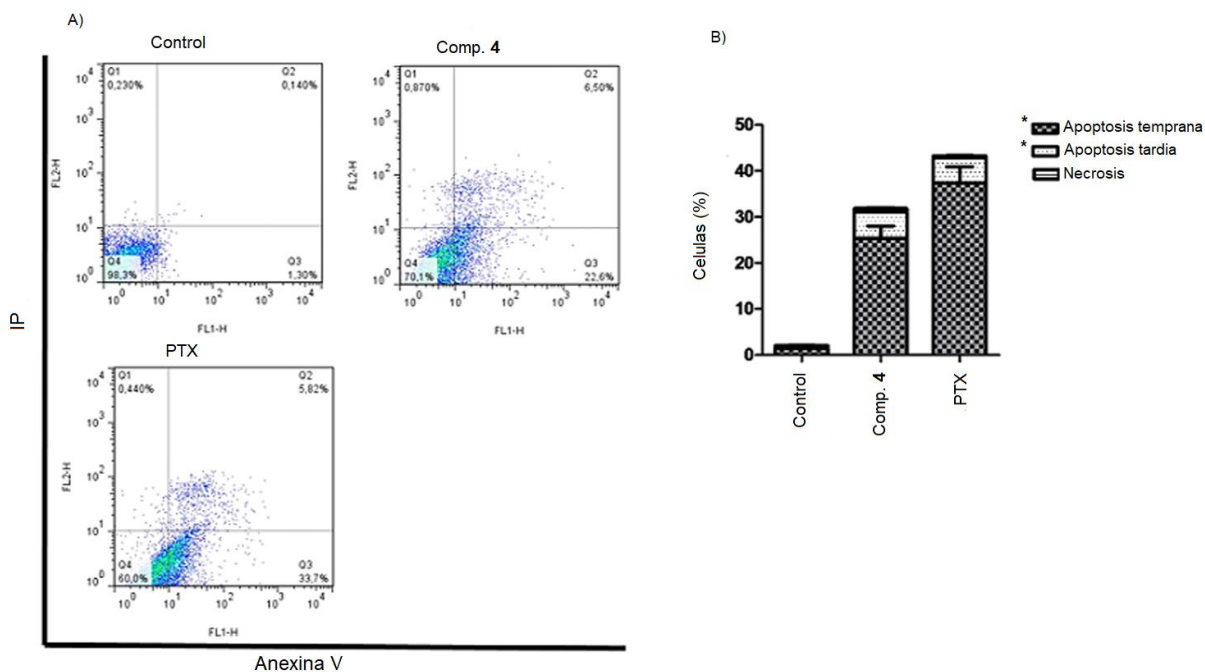


Figura 6.30. Análisis de la muerte celular por citometría de flujo utilizando tinción con Anexina V/IP. Células apoptóticas tempranas (Anexina V positivo y IP negativo; cuadrantes inferiores derechos), células apoptóticas tardías (Anexina V positivo y IP positivo; cuadrantes superiores derechos) y células necróticas (Anexina V negativo y IP positivo; cuadrantes superiores izquierdos). A) Control (células sin tratamiento), tratamiento con 16-hidroxi-licoperseno (**4**) a 21.3 μ M (12 μ g/mL) durante 72 h y tratamiento con PTX 20 nM. B) % de células. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ en comparación con el control.

Para constatar esta muerte celular apoptótica en las células Hep3B inducida por el compuesto **4**, se analizaron los cambios morfológicos. Las células Hep3B se trataron con **4** y se observaron mediante microscopía de fluorescencia después de la tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina. El tratamiento con el compuesto **4** (Fig. 6.31 B)) indujo la formación de cuerpos apoptóticos y condensación de la cromatina (núcleos de color verde brillante, ver flecha blanca), asimismo, no se observaron cambios característicos de necrosis. Estos cambios morfológicos fueron

similares a los inducidos por el H₂O₂ utilizado como control positivo de apoptosis (Fig. 6.31 C)). Por lo tanto, este estudio también indica que **4** induce apoptosis en las células Hep3B.

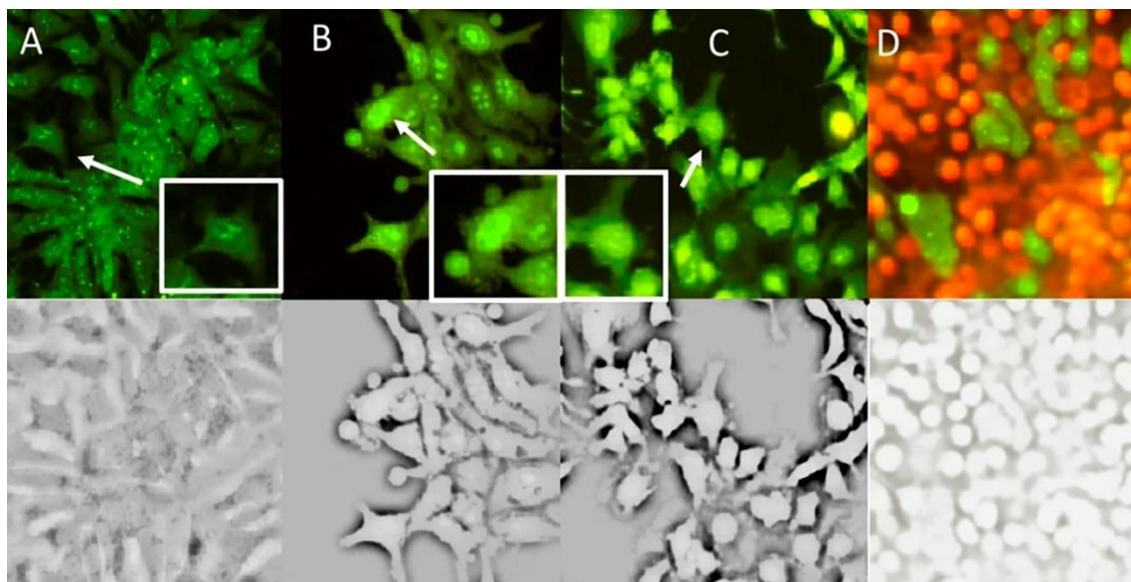


Figura 6.31. Análisis de la muerte celular de las células Hep3B utilizando microscopía de fluorescencia. A) Control negativo (sin tratamiento). B) Células tratadas con el compuesto **4** a 21.3 μ M (12 μ g/mL) durante 72 h. C) Células tratadas con el control positivo de la apoptosis H₂O₂. D) Control de necrosis.

Posteriormente, se determinó el efecto del compuesto **4** sobre los niveles de Bax y Bcl-2, y la activación de las caspasas 3/7 en las células Hep3B. Las caspasas juegan un papel clave en el inicio y la ejecución de la apoptosis. Está bien documentado que la activación de caspasa-9, causa la activación de caspasas efectoras (-3, -6 y -7) en la apoptosis de la vía intrínseca; también se observa un aumento de la expresión de Bax pro-apoptótica y la regulación a la baja del Bcl-2 anti-apoptótica (Naseri *et al.* 2015). Los resultados mostraron la inhibición de Bcl-2 y el aumento de los transcritos de Bax (Figura 6.32), aumentando así la relación Bax/Bcl-2 en comparación con el control no tratado. Además, se observó un claro aumento estadísticamente significativo en la activación de las enzimas de caspasas 3/7 (Figura 6.33). Estos resultados sugieren que el compuesto **4** causa la muerte celular en las células Hep3B por la vía apoptótica mitocondrial.

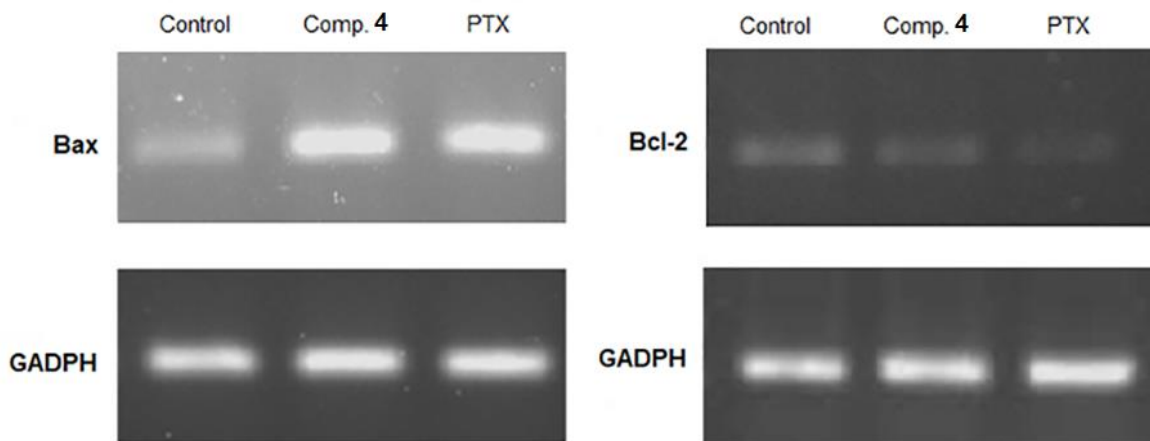


Figura 6.32. Efecto del compuesto **4** a 21.3 μM durante 72 h, sobre los niveles de expresión de ARNm de Bcl-2 y Bax en la línea celular HepB3. Se usó PTX (20 nM) como control positivo. GAPDH fue utilizado como un control interno.

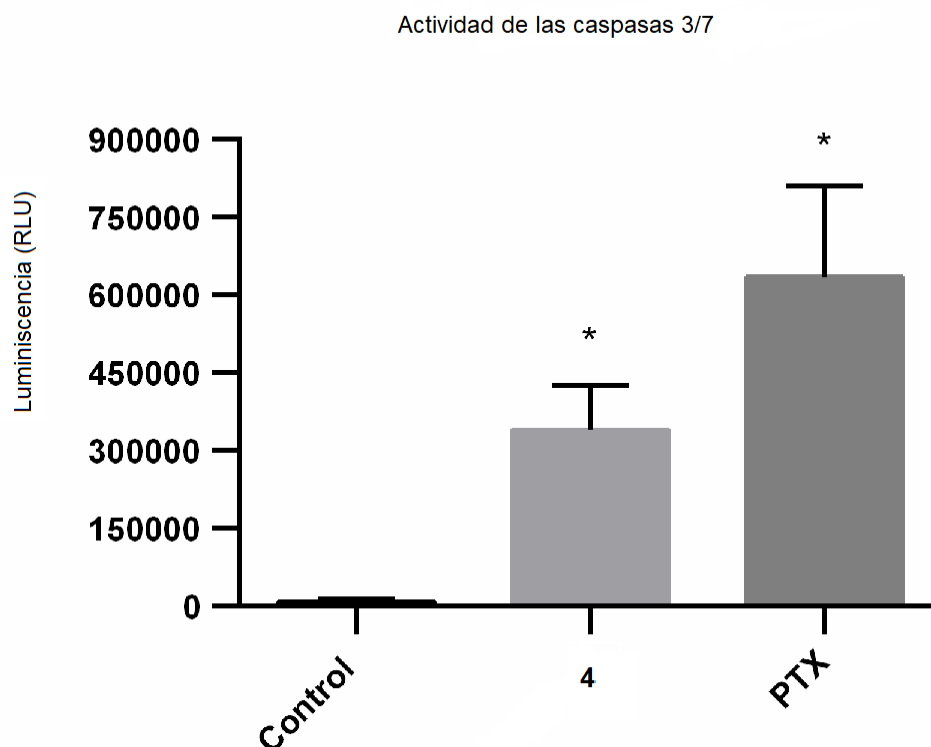


Figura 6.33 Activación de las caspasas 3/7 después del tratamiento con (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**) a 21.3 μM durante 72 h y el control positivo PTX (20 nM) en la línea celular Hep3B. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control.

Este es el primer trabajo sobre la actividad apoptótica del compuesto **4**. Anteriormente, se demostró la actividad apoptótica de compuestos que tienen analogía estructural al poliisoprenoide (*R*)-16-hidroxi-licoperseno (compuesto **4**): el dolicol fosfato (8 µg/mL) induce apoptosis en las células U937 a través de la cascada MAP quinasa (Dohi *et al.* 1996); dihidroheptaprenil y dihidrodecaprenil monofosfatos (6 µM) indujeron apoptosis en las células U937 mediada por la activación de tipo caspasa-3 (similar a CPP32) pero no por la activación de tipo caspasa-1 (similar a ICE) (Yasugi *et al.* 1998).

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Procedimientos experimentales generales

Los espectros de RMN 1D (^1H y DEPTQ) y 2D se adquirieron en un espectrómetro Bruker AVANCE III HD de 500 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ) y los espectros se referenciaron utilizando la señal del disolvente residual no deuterado. El espectro de masas ESI/Q-TOF se obtuvo con un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity II acoplado con un cuadrupolo de tiempo de vuelo Agilent 6545 equipado con una fuente de ionización de electrospray Agilent. El sistema GC-MS consistió en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 y un detector selectivo de masas Agilent 5970 en el modo de ionización electrónica a 70 eV con una columna HP-5ms (25 m x 0.2 mm, Hewlett Packard). El sistema de CLAE analítico consistió en un instrumento Agilent Technologies 1260 Infinity [bomba cuaternaria G1311B, autoinyector G1329A, compartimiento de columna termostaticado G1316A y detector de arreglo de diodos (DAD) G1315D] equipado con una columna Merck (Chromolith®, Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm). Un cromatógrafo de líquidos preparativo Agilent Technologies 1260 Infinity (bomba binaria G1361A, inyector manual, detector de arreglo de diodos G1315D) equipado con una columna Phenomenex (Kinetex® EVO, C-18, 150 x 10.0 mm, 5 μm , 100 Å) para la purificación de **4-6** y una columna Waters μ Porasil® silica (19 x 150 mm, 10 μm) para el fraccionamiento del extracto de diclorometano-acetato de etilo de las raíces de *P. ruderale*. Heptano, isopropanol (iPrOH) y metanol (MeOH) de grado HPLC se adquirieron de JT Baker. El agua fue de grado mili-Q. La rotación óptica se midió en un polarímetro digital Perkin-Elmer 341. Gel de sílice Merck (70-230 y 230-400 de malla) fue usada para la cromatografía en columna (CC) y placas de CCF (gel de sílice 60 F254, Merck) para analizar las fracciones las cuales se visualizaron con el revelador de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N seguido de calentamiento.

7.2 Colecta del material vegetal

7.2.1 Colecta de *Porophyllum ruderale*

Porophyllum ruderale subsp. *macrocephallum* es una especie cultivada en México principalmente por su uso comestible, por lo tanto, fue posible su obtención de las partes aéreas en un mercado de Cuernavaca, Morelos. Además, se colectaron las raíces y partes aéreas de forma silvestre en Yautepec, Morelos.

7.2.2 Colecta de *Tournefortia hirsutissima*

Las partes aéreas de *Tournefortia hirsutissima* L. fueron colectadas en Yautepec, Morelos, México en diciembre del 2015 e identificadas por el Biol. Gabriel Flores Franco. Un ejemplar de referencia (no. 33912) se depositó en el Herbario HUMO del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

7.3 Preparación de los extractos

7.3.1 Obtención de extractos de *Porophyllum ruderale*

Las raíces secas de *P. ruderale* (346 g) se cortaron en trozos de máximo 1 cm de largo y se extrajeron a temperatura ambiente y en la oscuridad con *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol en orden creciente de la polaridad (4 x 2 L, 24 h cada uno). Los extractos se filtraron y concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura de ≤ 40 °C, excepto para el metanólico (60 °C), dando como resultado los extractos hexano (H-Pr, rendimiento: 0.31%), de diclorometano (D-Pr, rendimiento: 0.36%), de acetato de etilo (AcOet-Pr, rendimiento: 0.09%), de acetona (A-Pr, rendimiento: 1.0%) y de metanol (MeOH-Pr, rendimiento: 3.48%).

7.3.2 Obtención de extractos de *Tournefortia hirsutissima*

Las hojas secas de *T. hirsutissima* (480 g) se pulverizaron y se extrajeron a temperatura ambiente con *n*-hexano, diclorometano y H₂O: CH₃OH (15: 85, v/v) en orden creciente de la polaridad (4 x 2 L, 24 h cada uno). Los extractos se filtraron y se concentraron en un evaporador rotatorio a 40 °C (extractos orgánicos) y 60 °C

(extracto hidroalcohólico), dando como resultado el extracto de hexano H-Th (rendimiento: 1.50%), el extracto de diclorometano D-Th (rendimiento: 0.63%) y el extracto hidroalcohólico HA-Th (rendimiento: 4.08%).

7.4 Aislamiento de los derivados de tiofeno (1–3)

Los extractos de D-Pr y AcOet-Pr se reunieron y se preparó una solución de esta mezcla a una concentración de 200 mg/mL. Esta solución se filtró a través de un filtro de 0.45 μm y se fraccionó por CLAE preparativo con las siguientes condiciones cromatográficas: columna $\mu\text{Porasil}^{\circledR}$ silica (19 x 150 mm, 10 μm); fase móvil CH_2Cl_2 - CH_3OH en gradiente (desde 100:00 hasta 70:30): flujo de 20 mL/min; temperatura ambiente; volumen de inyección de 500 μL ; tiempo de análisis de 17 min; detección DAD ($\lambda = 210 \text{ nm}$). Se colectaron 7 fracciones, definidas por rango de tiempo en min (1-2 (F1); 59 mg, 2-3.6 (F2); 68 mg, 3.6-5.7 (F3); 8 mg, 5.7-9.5 (F4); 155 mg, 9.5-9.9 (F5); 344 mg, 9.9-12 (F6); 112 mg y 12-16 min (F7); 42 mg) de acuerdo con los picos del cromatograma. Posteriormente, la fracción F1 (42 mg) se sometió a una separación mediante un cartucho de extracción en fase solida (C18, 1 gr) y un sistema de fase móvil CH_3OH - H_2O en gradiente (desde 80:20 hasta 100:00) para dar los compuestos **1** (82:18, 4.3 mg) y **2** (82:18, 4.0 mg). De la fracción F2 se obtuvo el compuesto **3** mediante una purificación por CLAE analítico con las siguientes condiciones cromatográficas: columna Performance RP-18e (100 x 4.6 mm); fase móvil CH_3CN - H_2O en gradiente (desde 73:27 hasta 93:7): flujo de 2.0 mL/min; temperatura 30 $^{\circ}\text{C}$; volumen de inyección de 15 μL (20 mg/mL); tiempo de análisis de 4.5 min; detección DAD ($\lambda = 364 \text{ nm}$). Con estas condiciones el cromatograma presentó 6 picos principales y la colección repetitiva del segundo pico con tiempo de retención de 1.29 min permitió la obtención de **3** (4.2 mg).

2,2':5',2''-tertiofeno (**1**). Agujas incoloras; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7.22 (2H, dd, $J = 5.1, 1.2 \text{ Hz}$, H-2' y H-5''), 7.18 (2H, dd, $J = 3.6, 1.2 \text{ Hz}$, H-4' y H-3''), 7.03 (2H, dd, $J = 5.1, 3.6 \text{ Hz}$, H-3' y H-4'') y 7.08 (2H, s, H-3 y H-4); EM-IE m/z (int. rel.): 248 $[\text{M}]^+$ (100) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{S}_3^+$, 203, 171. El rendimiento del compuesto **1** fue de $8.4 \times 10^{-3}\%$ con respecto al material vegetal seco, y de 2.9% con respecto a la mezcla D-Pr + AcOet-Pr (rendimiento: 0.45%).

5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**). Polvo amarillo; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.23 (1H, dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, H-5'), 7.18 (1H, dd, *J* = 3.6, 1.2 Hz, H-3'), 7.10 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-4), 7.04 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-3), 7.02 (1H, dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, H-4'), 6.03 (1H, dd, *J* = 17.5, 11.3 Hz, H-3''), 5.73 (1H, dd, *J* = 17.5, 2.0 Hz, H-4a'') y 5.56 (1H, dd, *J* = 11.3, 2.0 Hz, H-4b''). RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) δ_C: 139.15 (C-2), 123.67 (C-3), 132.97 (C-4), 121.93 (C-5), 136.85 (C-2'), 124.40 (C-3'), 125.17 (C-5'), 83.37 (C-1''), 93.10 (C-2''), 116.97 (C-3'') y 127.17 (C-4''); EM-IE *m/z* (int. rel.): 216 [M]⁺ (100) calculado para C₁₂H₈S₂⁺, 171. El rendimiento del compuesto **2** fue de 8.4 x 10⁻³% con respecto al material vegetal seco, y de 2.9% con respecto a la mezcla D-Pr + AcOet-Pr.

5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**). Aceite amarillo; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.25 (1H, dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, H-5'), 7.18 (1H, dd, *J* = 3.6, 1.2 Hz, H-3'), 7.15 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-4), 7.025 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-3), 7.02 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-4'), 5.86 (1H, dd, *J* = 7.4, 3.7, H-3''), 4.43 (1H, dd, *J* = 11.8, 3.7, H-4a'' o H-4b''), 4.31 (1H, dd, *J* = 11.8, 7.4, H-4a'' o H-4b''), 2.15 (3H, s, CH₃COO-(C-3'')) y 2.11 (3H, s, CH₃COO-(C-4'')); RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) δ_C: 170.59, 169.87, 134.32 (C-4), 128.12 (C-3), 125.44 (C-5'), 124.67 (C-3'), 123.49 (C-4'), 87.53 (C-2''), 80.20 (C-1''), 64.59 (C-4''), 62.60 (C-3''), 21.04 y 20.89; EM-IE *m/z* (int. rel.): 334 [M]⁺ calculado para C₁₆H₁₄O₄S₂⁺, 232 (100), 274, 219, 43. El rendimiento del compuesto **3** fue de 4.1 x 10⁻³% con respecto al material vegetal seco, y de 1.4% con respecto a la mezcla D-Pr + AcOet-Pr (rendimiento: 0.45%).

7.5 Estudio químico biodirigido de *Tournefortia hirsutissima*

7.5.1 Aislamiento de los alcoholes poliisoprenoides (4–6)

El extracto de *n*-hexano de *T. hirsutissima* (H-Th; 4.9 g) se fraccionó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (193 g, 70-230) eluyendo con un gradiente de *n*-hexano: acetona (desde 100: 00 a 00: 100, v/v). Se obtuvieron seis fracciones (F1 (100: 00); 72 mg, F2 (100: 00); 22 mg, F3 (99: 01); 25 mg, F4 (90: 10); 2968 mg, F5 (85: 15); 823 mg y F6 (00: 100); 123 mg) que se agruparon por CCF. F4 (2.5 g) se fraccionó sobre gel de sílice (100 g, 230-400) eluyendo con un gradiente de *n*-hexano: acetona (desde 96: 04 hasta 88: 12, v/v) para producir

cuatro subfracciones [F4-1 (96: 04); 53.3 mg, F4-2 (96: 04); 1086.0 mg, F4-3 (92: 08); 527.0 mg y F4-4 (88: 12); 623.0 mg] que se agruparon por CCF. F4-2 (1086.0 mg) se fraccionó mediante CC en gel de sílice (40 g, 230-400) eluyendo con un sistema isocrático de *n*-hexano: acetona (97: 03, *v/v*) para obtener F4-2-1; 140 mg y F4-2-2; 940 mg. F4-2-2 se solubilizó en isopropanol: metanol: heptano (60: 20: 20, *v/v*) a la concentración de 1,5 mg/mL y la solución se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m. Posteriormente, esta solución se sometió a análisis de CLAE a nivel analítico. Las condiciones cromatográficas que permitieron la separación de los componentes fueron las siguientes: Columna Merck (Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm); volumen de inyección de 7.0 μ L; caudal de 2,0 mL/min durante 7.5 min; la elución fue un gradiente de *i*PrOH: MeOH: H₂O (de 30: 67: 03 a 30: 70: 00, *v/v*); temperatura de 38 °C; detección a $\lambda = 210$ nm. Se identificaron tres picos principales en el cromatograma a tiempos de retención de 1.90, 4.14 y 5.43 min (Figura 6.18). El método anterior con modificaciones menores se utilizó para purificar **4–6** mediante CLAE a nivel preparativo. Las condiciones cromatográficas fueron: columna Phenomenex (C-18, 150 x 10.0 mm, 5 μ m, 100 Å); volumen de inyección de 200 μ L de F4-2-2 (50 mg/mL); caudal de 6,0 mL/min durante 10.0 min; la elución fue isocrática con 30% A: 70% B [A (100% de *i*PrOH) y B (99% de MeOH: 1% de H₂O)]; temperatura ambiente; detección a $\lambda = 210$ nm. La recolección de los picos con tiempos de retención de 2.25, 4.52 y 6.03 min de cinco inyecciones repetitivas resultó en el aislamiento de **4** (9.0 mg), **5** (17.5 mg) y **6** (10.7 mg), respectivamente.

(*R*)-(6*E*,10*E*,14*E*,18*E*,22*E*,26*E*)-2,6,10,14,19,23,27,31-octametildotriacont-2,6,10,14,18,22,26,30-octaen-16-ol ((*R*)-16-hidroxi-licoperseno (**4**)). Aceite amarillo claro; $[\alpha]_D^{24} + 5.3$ (c 0.8, CHCl₃); Los datos de RMN de ¹H y ¹³C se presentan en la Tabla 6.2; EM ESI/Q-TOF *m/z* 563.5238 [M + H]⁺ calculado para C₄₀H₆₇O, *m/z* 563.5186. El rendimiento del compuesto **4** fue de 5.2 x 10⁻²⁹% con respecto al material vegetal seco y de 3.4% con respecto al H-Th.

(*Z*₈,*E*₃, ω)-dodecaprenol (**5**). Aceite Amarillo claro; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H : 5.44 (1H, H-2), 5.17 – 5.06 (11H), 4.09 (2H, H-1), 2.13 – 1.94 (44H), 1.74 (3H, CH₃ en *Z*), 1.68 (24H, 8CH₃ en *Z*), 1.60 y 1.61 (12H, 4CH₃ en *E*); EM ESI/Q-TOF *m/z* 85.7942 [M + NH₄]⁺ calculado para C₆₀H₁₀₂NO, *m/z* 852.7961. El rendimiento del

compuesto **5** fue de $1.0 \times 10^{-1}\%$ con respecto al material vegetal seco y de 6.7% con respecto al H-Th.

(*Z*₉,*E*₃,*ω*)-tridecaprenol (**6**). Aceite Amarillo claro; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 5.44 (1H, H-2), 5.15 – 5.07 (12H), 4.09 (2H, H-1), 2.11 – 1.95 (48H), 1.74 (3H, CH₃ en *Z*), 1.68 (27H, 9CH₃ en *Z*), 1.60 y 1.61 (12H, 4CH₃ en *E*); EM ESI/Q-TOF *m/z* 920.8548 [M + NH₄]⁺ calculado para C₆₅H₁₁₀NO, *m/z* 920.8587. El rendimiento del compuesto **6** fue de $6.1 \times 10^{-2}\%$ con respecto al material vegetal seco y de 4.1% con respecto al H-Th.

7.6 Preparación de los ésteres (*S*) y (*R*)-MTPA de **4** (**4a** y **4b**)

Una solución en agitación del compuesto **4** (2.5 mg, 1 eq) en piridina-*d*₅ (0,1 mL) se trató con cloruro de (*R*)-MTPA [10 μL (12 eq)] bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche para obtener el éster de (*S*)-MTPA (**4a**). Se realizó el mismo procedimiento para preparar el éster de (*R*)-MTPA (**4b**) con cloruro de (*S*)-MTPA. Los cloruros de (*R*)-MTPA y (*S*)-MTPA se adquirieron de Sigma Aldrich.

Éster de (*S*)-MTPA de **4** (**4a**). Datos de RMN ¹H (500 MHz, piridina-*d*₅) δ_H 5.321 (1H, H-15), 2.657 and 2.470 (2H, H-17), 5.348 (1H, H-18), 1.676 (3H, H-36).

Éster de (*R*)-MTPA de **4** (**4b**). Datos de RMN ¹H (500 MHz, piridina-*d*₅) δ_H 5.471 (1H, H-15), 2.593 and 2.432 (2H, H-17), 5.231 (1H, H-18), 1.618 (3H, H-36).

7.7 Viabilidad celular de las células RAW 264.7

Las células RAW 264.7 (línea celular de macrófagos murinos) fueron adquiridas de la ATCC y se cultivaron en medio DMEM / F12 avanzado (Gibco) suplementado con GlutaMAX al 1% (Gibco) y SFB inactivado al 3,5% (Gibco), sin antibióticos a 37 °C en 5% de CO₂.

La viabilidad celular se determinó utilizando MTS de Promega. Las células (1 x 10⁴ células por pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos en 100 μl de medio y se incubaron durante 24 h. Luego, las células se trataron con diversas concentraciones de las muestras investigadas, control positivo (etopósido, 30 μg/mL) o vehículo (DMSO al 0.4% en medio de cultivo) y se incubaron durante 24 h.

Posteriormente, se agregaron 20 µl de MTS a las 20 h de tratamiento durante 4 h, después de eso, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de microplacas. La absorbancia de las células de control (sin tratar) se tomó como el 100% de viabilidad. La concentración de DMSO junto con los tratamientos, en el medio de cultivo fue $\leq 0.4\%$, v/v.

7.8 Medición de la concentración de Nitrito

El nitrito es un metabolito estable del NO y su concentración se calculó con la ayuda de una curva estándar de NaNO₂. Las células RAW 264.7 se sembraron en placas de 96 pocillos (2×10^4 células en 200 µL) y se incubaron durante 24 h, luego se trataron con diversas concentraciones de las muestras investigadas, indometacina (30 µg/mL) o DMSO (0.4 %, v/v) durante 2 h seguido de la estimulación con 1 µg/mL de LPS (de *E. coli* comprado de Sigma Aldrich) durante 21 h. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes libres de células (50 µl) y se incubaron durante 10 minutos con el reactivo de Griess (50 µl de dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina al 0.1% y 50 µl de sulfanilamida al 1% ambos en 2.5% de ácido fosfórico) a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 540 nm utilizando un lector de microplacas.

7.9 Edema en oreja de ratón inducido por TPA

El edema en ratones se indujo con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) adquirido de Sigma Aldrich, siguiendo el método descrito anteriormente (Payá *et al.* 1993). Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y las pautas éticas internacionales para el cuidado y uso de animales experimentales. Los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho ICR que pesaban entre 25-30 g (cinco animales por tratamiento). La dosis evaluada para los extractos y la indometacina (control positivo) fue de 1 mg/oreja. Los tratamientos se aplicaron por vía tópica en la oreja derecha y el vehículo en la oreja izquierda, enseguida, se indujo el edema mediante la administración tópica de TPA (2.5 µg) en ambas orejas. Seis horas después de la administración de TPA, los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

Posteriormente, se tomaron secciones circulares de 6 mm de diámetro de las orejas tratadas y no tratadas y se pesaron para determinar la inflamación. El porcentaje de inhibición del edema se determinó mediante la fórmula expresada a continuación:

$$\% \text{ de inhibición: } \frac{\Delta w \text{ control} - \Delta w \text{ tratamiento}}{\Delta w \text{ control}} (100)$$

donde el control se refiere al grupo de animales tratados solo con el vehículo en ambas orejas y el inductor TPA en la oreja derecha y $\Delta w = wt - wnt$, wt : peso de las orejas tratadas y wnt : peso de las orejas no tratadas.

7.10 Ensayo antiproliferativo

Las líneas celulares de cáncer humano PC3 (próstata), HeLa (cervical) y Hep3B y HepG2 (hepatocelular) se adquirieron de la ATCC. También incluimos la línea celular de hepatocitos humanos inmortalizados (IHH) como control de células no cancerosas (Basu *et al.* 2006). PC3 se cultivó en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich), mientras que Hep3B, HepG2, HeLa e IHH en medio DMEM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de SFB y 2 mM de glutamina, todos los cultivos se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂.

Se sembraron 4×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se trataron con las muestras investigadas (a 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/ mL) y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5% durante 72 h. Se utilizó PTX como control positivo. El número de células viables en proliferación se verificó mediante el ensayo MTS, siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió a $\lambda = 450$ nm utilizando un lector de ELISA automatizado.

7.11 Análisis del ciclo celular

Las células PC3, Hep3B, HepG2 y HeLa (1.25×10^5 células/pozo) se colocaron en placas de 6 pozos y se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5%. Las células en crecimiento exponencial se trataron con las muestras investigadas durante 72 h de acuerdo con los valores de CI₅₀. Se incluyó PTX (10 nM) como control positivo del arresto de la fase G₂/M. Las células de cada tratamiento se tripsinizaron y se recogieron en suspensiones de células individuales, se centrifugaron y se fijaron en

etanol frío (70%) durante la noche a -20 °C. Las células se trataron luego con RNasa 0.01 M (Sigma Aldrich) y se tiñeron con 7.5 µg/mL de Ioduro de propidio (IP) (Invitrogen) durante 30 minutos en la oscuridad. El porcentaje de células en las fases sub-G₁, G₁, S y G₂/M se analizó con un citómetro de flujo (Becton Dickinson, FACS Calibur) utilizando 10,000 células para cada muestra. Los datos obtenidos del citómetro de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo.

7.12 Estudio de la muerte celular por tinción con Anexina V y IP

La apoptosis se evaluó utilizando el kit de detección de apoptosis Anexina V FITC (Thermo Fisher Scientific). Las células Hep3B (2.5 x 10⁵ células) se trataron con el compuesto **4** a 21.31 µM. Además, se trataron PTX (20 nM) como control positivo de la apoptosis. Después de 72 h, las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS frío (0.01 M, pH = 7.2). Después de 5 min de centrifugación a 200 g. La tinción con Anexina V-FITC / PI se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La apoptosis celular se analizó en un citómetro de flujo (10,000 células para cada muestra). Los datos obtenidos del citómetro de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo.

7.13 Observación de la morfología celular

Los cambios morfológicos de las células Hep3B expuestas al compuesto **4** se evaluaron usando tinción con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE). En resumen, las células Hep3B (2 x 10⁴ células por pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos y se expusieron con **4** a 21.31 µM durante 72 h. Después de 72 h de tratamiento, las células se expusieron a una solución de 100 µg/mL de NA y 100 µg/mL de BE, de acuerdo con los procedimientos informados (Kasibhatla *et al.* 2006). Para los controles, las células se cultivaron 71 h antes de ser tratadas 30 min con H₂O₂ (control positivo de la apoptosis) o hirviendo en agua a 95 °C durante 10 s (control positivo de necrosis). Luego, se observaron las células utilizando un microscopio de fluorescencia.

7.14 RT-PCR

1.25 x 10⁵ células Hep3B se trataron con **4** a 21.31 μM durante 72 h, luego se aisló el ARN total empleando un kit MiniPrep de ARN rápido (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó utilizando NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y el contenido de ARN se normalizó. La RT-PCR se realizó utilizando un kit de RT-PCR de un solo paso con Thermo-Start Taq (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó con las siguientes secuencias de cebadores: Bcl-2 (F 5'-TAC AGG CTG GCT CAG GAC TAT-3'; R 5'-CGC AAC ATT TTG TAG CAC TCT G-3'), Bax (F 5'-CCC GAG AGG TCT TTT TCC GAG-3'; R 5'-CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT-3'), GAPDH (F 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3'; R 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'). La secuenciación se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los productos de reacción de las muestras se analizaron en gel de agarosa al 1.5%.

7.15 Actividad de las caspasas 3/7

Las células Hep3B (8 x 10³ células por pocillo) se colocaron en placas de 96 pocillos y se trataron con el compuesto **4** a 21.31 μM durante 72 h. Después del tratamiento, la actividad de la caspasa 3/7 se determinó utilizando el ensayo luminiscente Caspase-Glo® 3/7 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron representados como unidades relativas de luminiscencia.

7.16 Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se sometieron en el software GraphPad Prism® versión 6.0. La significación estadística se realizó mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett. $p < 0.05$ se consideró como significativo.

8. CONCLUSIONES

A partir de las raíces de la especie *Porophyllum ruderale* se aislaron los compuestos derivados de tiofeno: 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**), 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**) y 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**). La evaluación de la actividad antiproliferativa de los tres compuestos contra las líneas celulares de cáncer humano HepG2, Hep3B, A549 y HeLa, demostró que fueron más activos en las líneas celulares de cáncer hepatocelular (HepG2 y Hep3B). El compuesto más activo resultó ser 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**), lo que sugiere, que la actividad antiproliferativa incrementa con el aumento en el número de anillos de tiofeno. Además, los compuestos **1–3** fueron menos activos contra las células IHH no cancerosas, evidenciando la selectividad hacia las líneas celulares de cáncer hepatocelular. Por otra parte, el efecto de **1–3** sobre el ciclo celular de las células Hep3B, fue diferencial: los tres compuestos aumentaron subG₁, sin embargo, hubo un incremento de las fases S y G₂/M por los compuestos **2** y **3**, respectivamente. Estos resultados sugieren que los derivados de tiofeno **1–3** inducen la muerte de las células Hep3B a través de diferentes mecanismos de acción.

Del estudio químico dirigido por la actividad antiinflamatoria de la planta *Tournefortia hirsutissima* se aislaron y purificaron los compuestos (*R*)-16-hidroxicopersenol (**4**), (*Z*₈,*E*₃, ω)-dodecaprenol (**5**) y (*Z*₉,*E*₃, ω)-tridecaprenol (**6**). El método de los ésteres de Mosher, con ayuda de los cloruros de ácido como resolutivos quirales y la RMN, permitió determinar la configuración absoluta del compuesto **4**. El compuesto **4** presentó actividad antiinflamatoria moderada al inhibir la producción de óxido nítrico en las células RAW 264.7 estimuladas con LPS (28.55 \pm 1.81% de inhibición a 14.4 μ g/mL). Además, el compuesto **4** presentó actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer humano HepG2, Hep3B, PC3 y HeLa, y la línea IHH, siendo más activo contra Hep3B y menos activo contra IHH. De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad antiproliferativa de **4** sobre las células Hep3B se debe a la inducción de muerte celular a través de la vía apoptótica mitocondrial.

9. PERSPECTIVAS

Analizar la composición química de los picos con tiempos de retención de 1.05, 1.48, 1.90, 2.31, 2.65 y 3.85 minutos del cromatograma de la Figura 6.1.

Determinar si los compuestos 2,2':5',2''-tertiofeno (**1**), 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**2**) y 5-(3'',4''-diacetoxi-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**) inducen muerte celular apoptótica sobre las células Hep3B.

Evaluar la actividad antitumoral de 16-hidroxi-licoperseno (**4**) frente a la línea celular Hep3B en un modelo *in vivo*.

Preparar el derivado fosfatado de 16-hidroxi-licoperseno (**4**) y determinar su actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares HepG2, Hep3B, PC3 y HeLa, para establecer si el grupo fosfato le confiere mayor actividad.

10. REFERENCIAS

- Alarcón-Aguilar, F. J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. C. and Flores-Saenz, J. L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), pp.101–110.
- American Type Culture Collection [ATCC] (2019). Disponible en: <https://www.atcc.org/>. Fecha de consulta 16/08/2019.
- Andrade-Cetto, A., Revilla-Monsalve, C. and Wiedenfeld, H., 2007. Hypoglycemic effect of *Tournefortia hirsutissima* L., on n-streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1), pp.96–100.
- Andrade-Neto, M., Cunha, A. N. and Silveira, E. R., 1994. Volatile Constituents of *Porophyllum ruderale* Cass. *Journal of Essential Oil Research*, 6(4), pp.415–417.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M. and Nelson, R. J., 2012. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), pp.385–406.
- Aviello, G., Borrelli, F., Guida, F., Romano, B., Lewellyn, K., De Chiaro, M., Luongo, L., Zjawiony, J. K., Maione, S., Izzo, A. A. and Capasso R., 2011. Ultrapotent effects of salvinatorin A, a hallucinogenic compound from *Salvia divinorum*, on LPS-stimulated murine macrophages and its anti-inflammatory action in vivo. *J. Mol. Med*, 89(9), pp.891–902.
- Basu, A., Saito, K., Meyer, K., Ray, R., Friedman, S., Chang, Y. and Ray R, 2006. Stellate cell apoptosis by a soluble mediator from immortalized human hepatocytes. *Apoptosis*, 11(8), pp.1391–1400.
- Bohlmann, F., Jakupovic, J., Robinson, H., and King, R. M., 1980. A dithienylacetylene from *Porophyllum ruderale*. *Phytochemistry*, 19(12), p.2760.

- Bohlmann, F. and Zdero, C., 1979. Über dimere terpenketone aus *Tagetes gracilis*. *Phytochemistry*, 18(2), pp.341–343.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, M., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp.394–424.
- Claire M. Pfeffer and Amareshwar T. K. Singh., 2017. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 448.
- Coogan, C., Horn, D., and Lamberton, J., 1965. Nuclear magnetic resonance studies. IV. The analysis of the spectra of two thiophene derivatives. *Australian Journal of Chemistry*, 18(5), pp.723-729.
- Cragg, G.M. and Pezzuto, J.M., 2016. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*, 25(2), pp.41–59.
- Dinarello, C.A., 2010. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140(6), pp.935–950.
- Dohi, T., Yasugi, E. and Oshima, M., 1996. Activation of Mitogen Activated Protein Kinase in Dolichyl Phosphate-Induced Apoptosis in U937 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(1), pp.87–91.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp.495–516.
- Menelaou, M. A., Fronczek, F. R., Hjortso, M. A., Morrison, A. F., Foroozesh, M., Thibodeaux, T. M., Flores, H. E. and Fischer, N. H., 1991. NMR Spectral Data of Benzofurans and Bithiophenes from Hairy Root Cultures of *Tagetes Patula* and the Molecular Structure of Isoeuparin. *Spectroscopy Letters*, 24(10), pp.1405–1413.

- Guillet, G., Bélanger, A. and Arnason, J.T., 1998. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): identification, localization and insecticidal synergism with α -terthienyl. *Phytochemistry*, 49(2), pp.423–429.
- Hernández, M.Á., Rojas, F., Portillo, R., Salvado, M. A., Petranovskii, V. and Quiroz, K., 2016. Textural Properties of Hybrid Biomedical Materials Made from Extracts of *Tournefortia hirsutissima* L. Imbibed and Deposited on Mesoporous and Microporous Materials. *Journal of Nanomaterials*, 2016(January), pp.1–10.
- Hesek, D., Lee, M., Zajíček, J., Fisher, J. F. and Mobashery, S., 2012. Synthesis and NMR Characterization of (Z,Z,Z,Z,E,E, ω)-Heptaprenol. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(33), pp. 13881-13888.
- Hoye, T.R., Jeffrey C.S. and Shao F., 2007. Mosher ester analysis for the determination of absolute configuration of stereogenic (chiral) carbinol carbons. *Nature Protocols*, 2(10), pp. 2451-2458.
- Ibrahim, S.R.M., Abdallah, H. M., El-Halawany, A. M. and Mohamed, G. A., 2016. Naturally occurring thiophenes: isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. *Phytochemistry Reviews*, 15(2), pp.197–220.
- Ibrahim, S.R.M. and Mohamed, G.A., 2017. Thiotagetin A, a new cytotoxic thiophene from *Tagetes minuta*. *Natural Product Research*, 31(5), pp.543–547.
- Jin, W., Shi, Qiang., Hong, Chengtao., Cheng, Yiyu., Ma, Z. and Qu, H., 2008. Cytotoxic properties of thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. *Phytomedicine*, 15(9), pp.768–774.
- Kashyap, D., Tuli, H.S. and Sharma, A.K., 2016. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* 146, pp.201–213.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G.P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E. and Green, D.R., 2006. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(21), p.pdb.prot4493-pdb.prot4493.

- Lans, C. A., 2006. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), p.45.
- Lanzetta, R., Monaco, P., Previtiera, L. and Simaldone, A., 1988. Polyprenols and hydroxylated lycopersenes from *Myriophyllum verticillatum*. *Phytochemistry*, 27(3), pp.887–890.
- Lara, D., Boettler, R. and Ovando, L., 2011. Diagnóstico del pápaloquelite en México, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. var. *macrocephalum* (DC.) Cronq. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/231821/Diagnostico_del_papaloquelite_en_mexico.pdf.
- Lechner, M., Lirk, P. and Rieder, J., 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4), pp.277–289.
- Lee, J.-S., Ahn, J.-H., Cho, Y.-J. Lee, J.-S., Kim, H.-Y., Yang, Y.-I., Lee, K.-T., Jang, D.-S. and Choi, J.-H., 2015. α -Terthienylmethanol, isolated from *Eclipta prostrata*, induces apoptosis by generating reactive oxygen species via NADPH oxidase in human endometrial cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 169, pp.426–434.
- Lee, M., Heseck, D., Lee, M., Zajíček, J., Fisher, J. F. and Mobashery, S., 2017. Synthesis and shift-reagent-assisted full NMR assignment of bacterial (Z_8 , $E_{2,\omega}$)-undecaprenol. *Chemical Communications*, 53(95), pp.12774–12777.
- Liang, C.-H., Wang, G.-H., Chou, T.-H., Wang, S.-H., Lin, R.-J., Chan, L.-P., So, E. C. and Sheu, J.-H., 2012. 5-*epi*-Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(7), pp.1149–1157.

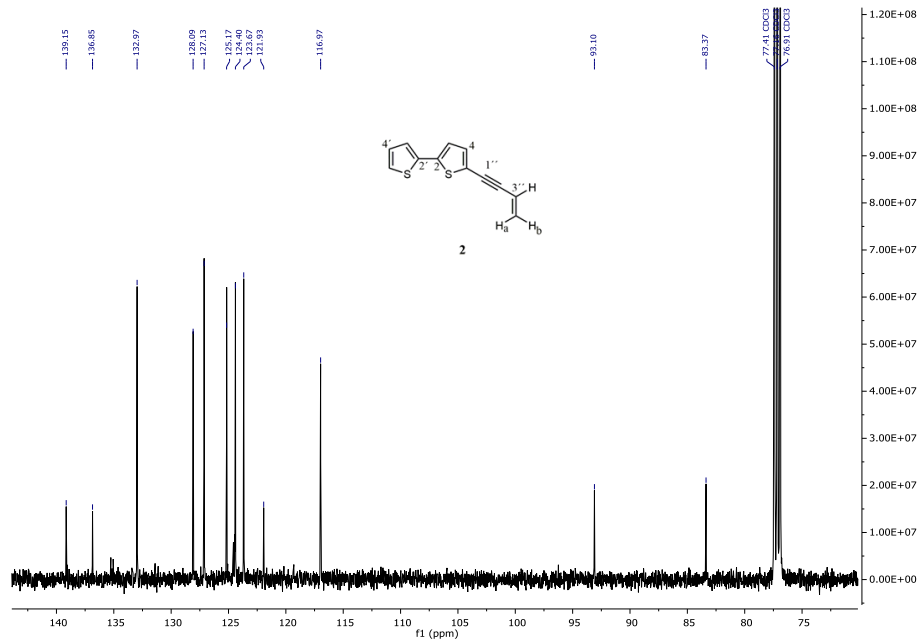
- Loayza, I., W. de Groot., Lorenzo, D., Dellacassa, E., Mondello, L. and Dugo, G., 1999. Composition of the essential oil of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass . from Bolivia. *Flavour Fragrance and Journal*, 14(6), pp.393–398.
- Lu, H., Ouyang, W. and Nelson, C. H., 2006. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research*, 4(4), pp.221–233.
- Maldonado-Almanza, B.J., 1997. Aprovechamiento de los recursos florísticos en la Sierra de Huautla, Morelos. Tesis de Maestría. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mazari, E.L. and Boettler, R.B., 2015. Las especies subutilizadas de la milpa. *Revista Digital Universitaria*, 16(5), pp.1–22. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art35/>.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.428–435.
- Monaco, P., Previtera, L. and Belardini, M., 1983. Polyprenols from the leaves of *Quercus ilex* infected by *Microsphaera alphitoides*. *Journal of Natural Products*, 46(2), pp.174–177.
- Misiak, M., Kozminski, W., Kwasiborska, M., Wojcik, J., Ciepichal, E. and Swiezewskab, E., 2009. Complete ¹H and ¹³C signal assignment of prenol-10 with 3D NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 2009(47) pp. 825–829.
- Naseri, M.H., Mahdavi, M., Davoodi, J., Tackallou, S. H., Goudarzvand, M. and Neishabouri, S. H., 2015. Up regulation of Bax and down regulation of Bcl2 during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Cell International*, 15(1), p.55.
- Nisar, M., He, J., Ahmed, A., Yang, Y., Li, M. and Wan, C., 2018 Chemical Components and Biological Activities of the Genus *Phyllanthus*: A Review of the Recent Literature. *Molecules*, 23, 2567.

- O'Brien, S. and Borthakur, G., 2012. Pharmacology and clinical potential of oblimersen sodium in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, 2012(2), pp.137–143.
- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2018). Cáncer. [Pagina de internet]. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Fecha de consulta 17/agosto/2019.
- Ormerod, M. G., Collins, M. K. L., Rodriguez-Tarduchy, G. and Robertson, D., 1992. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *Journal of Immunological Methods*, 153(1–2), pp.57–65.
- Parsaeimehr, A., Yi-Feng, C. and Elmira, S. Chapter 12 - Bioactive Molecules of Herbal Extracts with Anti-Infective and Wound Healing Properties, *Microbiology for Surgical Infections*. Academic Press, 2014, pp. 205–220.
- Parsaeimehr, A., Martinez-Chapa, S. O. and Parra-Saldivar, R. Chapter 13 - Medicinal Plants Versus Skin Disorders: A Survey From Ancient to Modern Herbalism. Vol. 2. In *Clinical Microbiology: Diagnosis, Treatments and Prophylaxis of Infections, the Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections*. Academic Press, 2017, pp. 205–221.
- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Bustos, G., Blasco, R., Rios, J. L. and Alcaraz, M. J., 1993. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*, 7(2), pp.159–162.
- Raggi, L., Younga, M. C. M., Cordeirob, I. and Moreno P. R. H., 2015. Differentiation of two *Porophyllum ruderale* (Jacq .) Cass . subspecies by the essential oil composition. *Journal of Essential Oil Research*, 27(1), pp.30–33.
- Richardson, A. and King, W. K., 2009. *Tournefortia hirsutissima* (Boraginaceae) New to the Flora of Texas. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 3(1), pp.465–467.

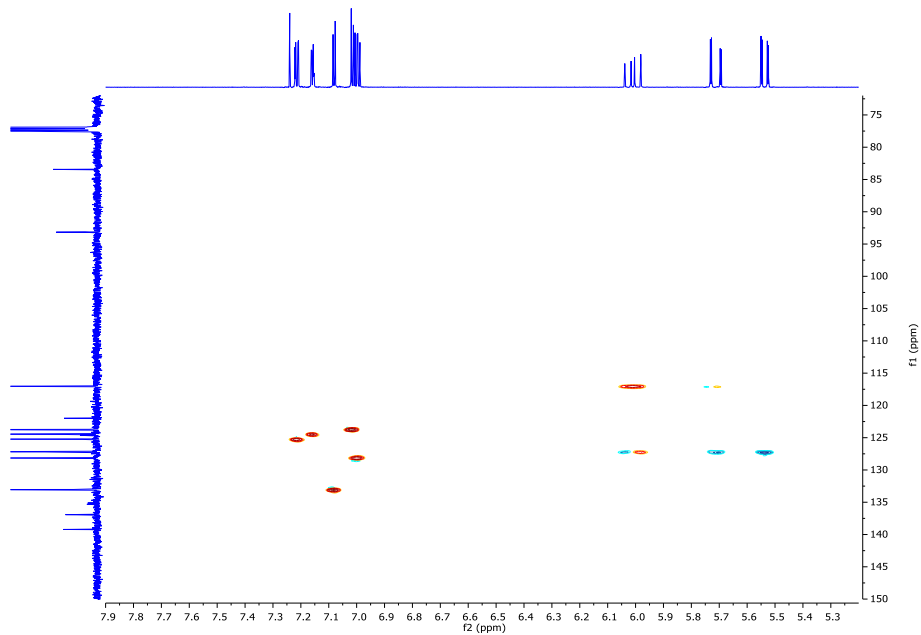
- Sitkowski, J., Bocian W. and Szterk, A., 2018. The application of multidimensional NMR analysis to *cis/trans* isomers study of menaquinone-7 (vitamine K2MK-7), identification of the (*E,Z3,E2,ω*)-menaquinone-7 isomer in dietary supplements, *Journal of Molecular Structure*, 1171, pp.449-457.
- Skorupinska-tudek, K., Wojcik, J. and Swiezewska, E., 2007. Polyisoprenoid Alcohols—Recent Results of Structural Studies. *The Chemical Record*, 2008 (8), pp.33–45.
- Souza, M.C., Siani, A. C., Ramos, M. F. S., O. Menezes-de-Lima, Jr. and Henriques, M. G. M. O., 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Die Pharmazie*, 58(8), pp.1–5.
- Takahashi, H.T., Novello, C.R., Ueda-nakamura, T., Filho, B. P. D., Palazzo de Mello, J. C. and Nakamura, C. V., 2011. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules*, 16(5), pp.3469–3478.
- Torre L. A., Bray F., Siegel R. L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J. and Jemal A., 2012. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2015(65), pp.87-108.
- Van Quan, N., Xuan, T. D., Tran, H. D., Thuy, N. T. D., Trang, L. T., Huong, C. T., Andriana, Y. and Tuyen, P. T., 2019 Antioxidant, α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activities and Potential Constituents of *Canarium tramdenum* Bark. *Molecules*, 24, 605.
- Villarreal-Quintanilla J. A. y Villaseñor J. L., 2004. Familia Compositae, Tribu Tageteae. Flora de Veracruz. Xalapa, Veracruz - Riverside, California: Instituto de Ecología, A.C. y University of California. 135: 1-67.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. and McPhail, A.T., 1971, Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc*, 93, pp.2325–2327.
- Wong, R.S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), p.87.

- Yao, X. Lu, B., Lü, C., Bai, Q., Yan, D., Wu, Y., Honga, Z. and Xu, H., 2017. Solanesol induces the expression of heme oxygenase-1 via p38 and Akt and suppresses the production of proinflammatory cytokines in RAW264.7 cells. *Food & Function*, 8(1), pp.132–141.
- Yasugi, E., Nakata, K., Yokoyama, Y., Dohi, T., Kano, K. and Oshima M., 1998. Dihydroheptaprenyl and dihydrodecaprenyl monophosphates induce apoptosis mediated by activation of caspase-3-like protease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1389(2), pp.132–140.
- Zhang, P., Jin, W.-R., Shi, Q., He, h., Ma, Z.-J. and Qu, H.-B., 2008. Two novel thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(10), pp.977–981.

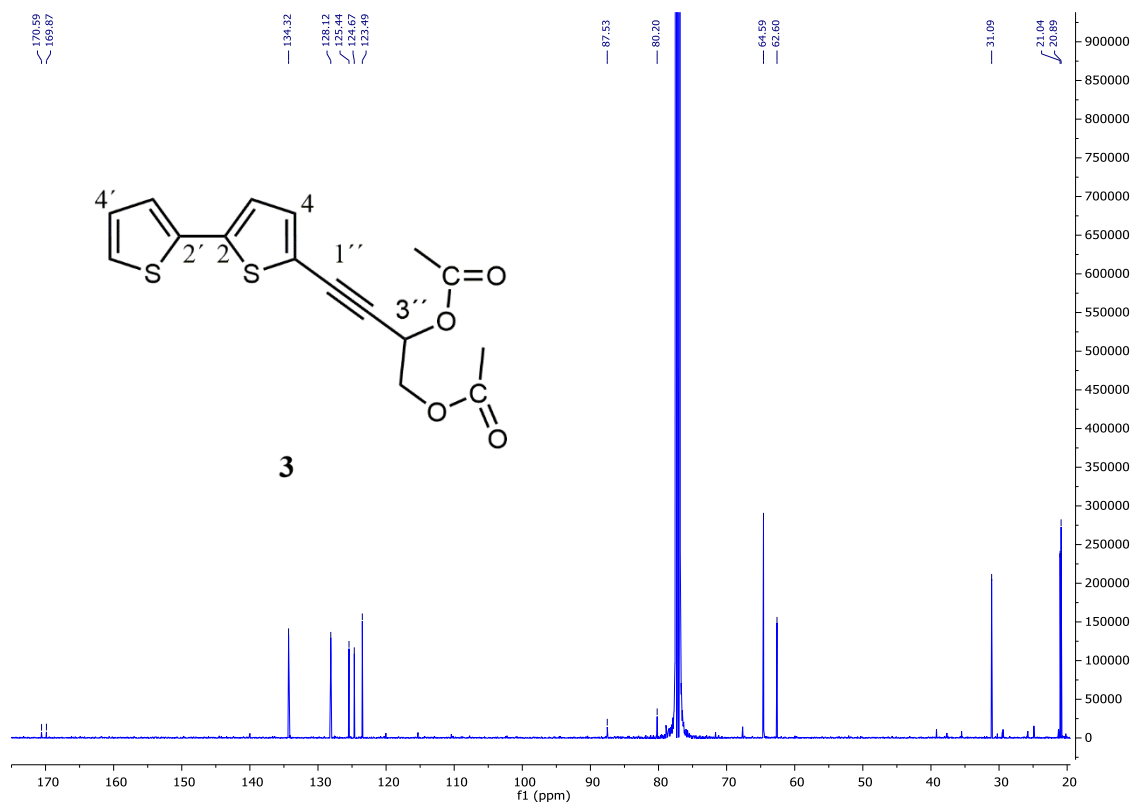
11. ANEXO



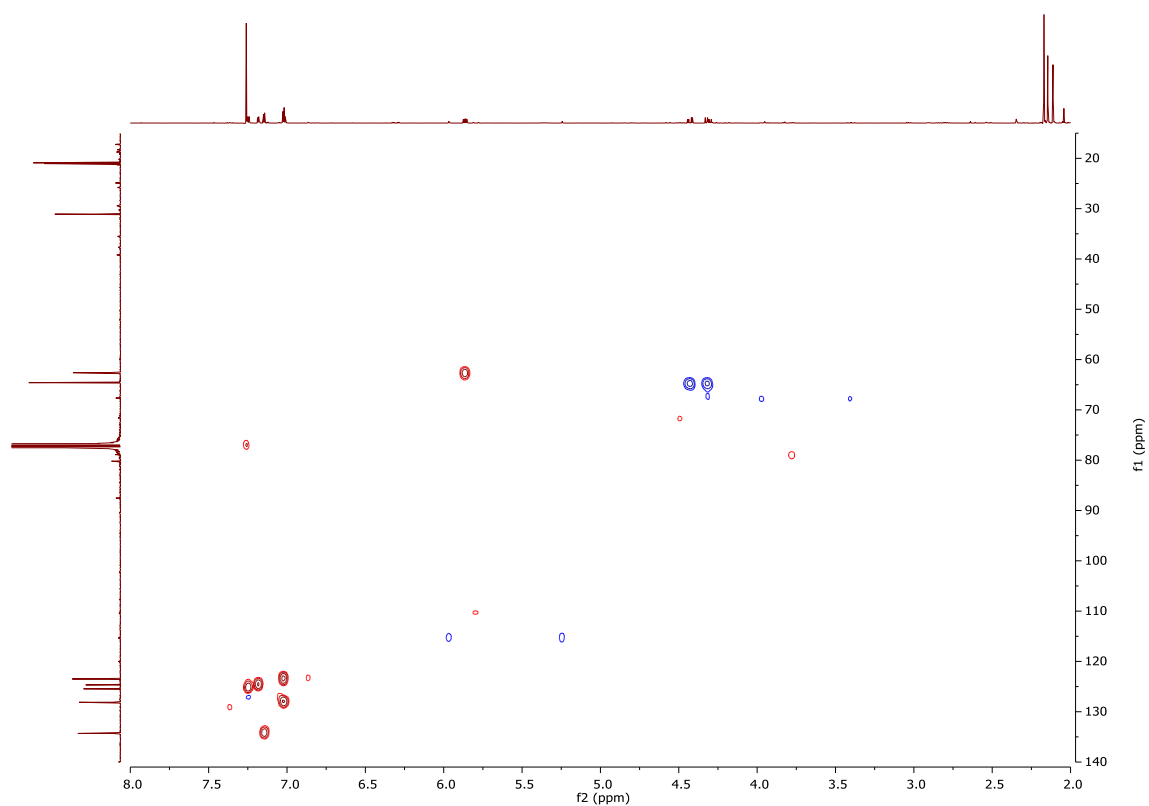
Espectro 1. RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).



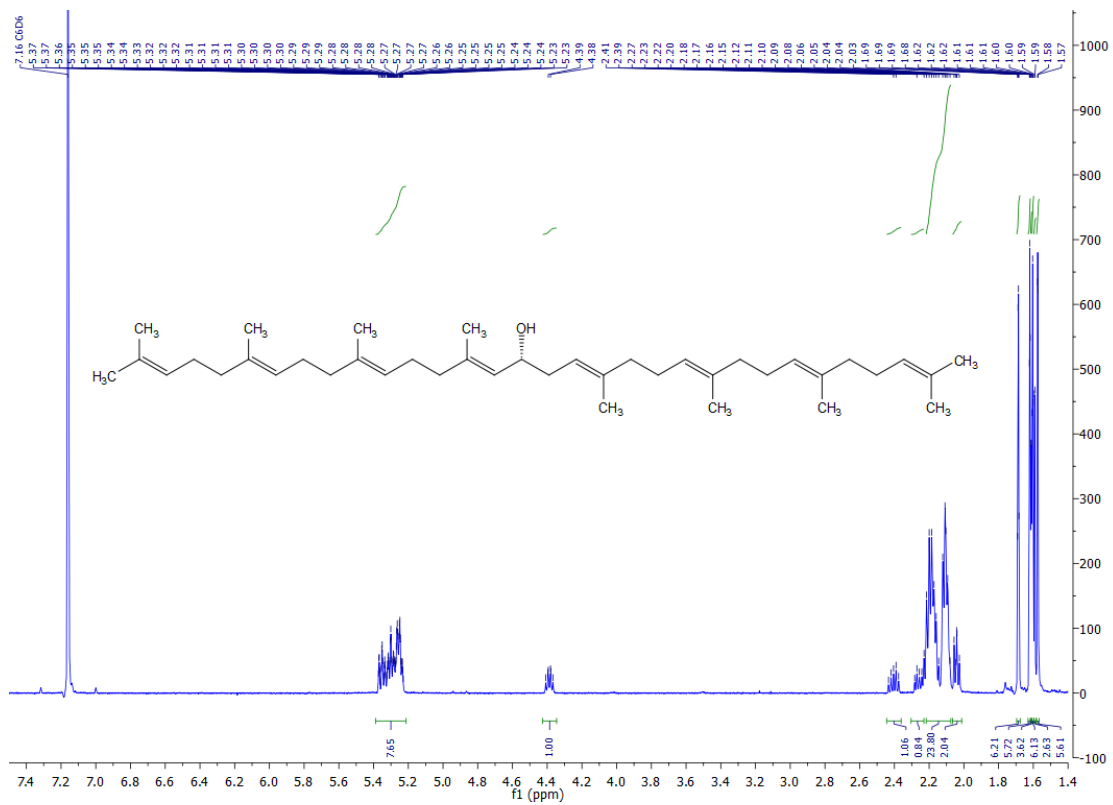
Espectro 2. HSQC (500 MHz, CDCl₃) de 5-(3''-buten-1''-inil)-2,2'-bitiofeno (2).



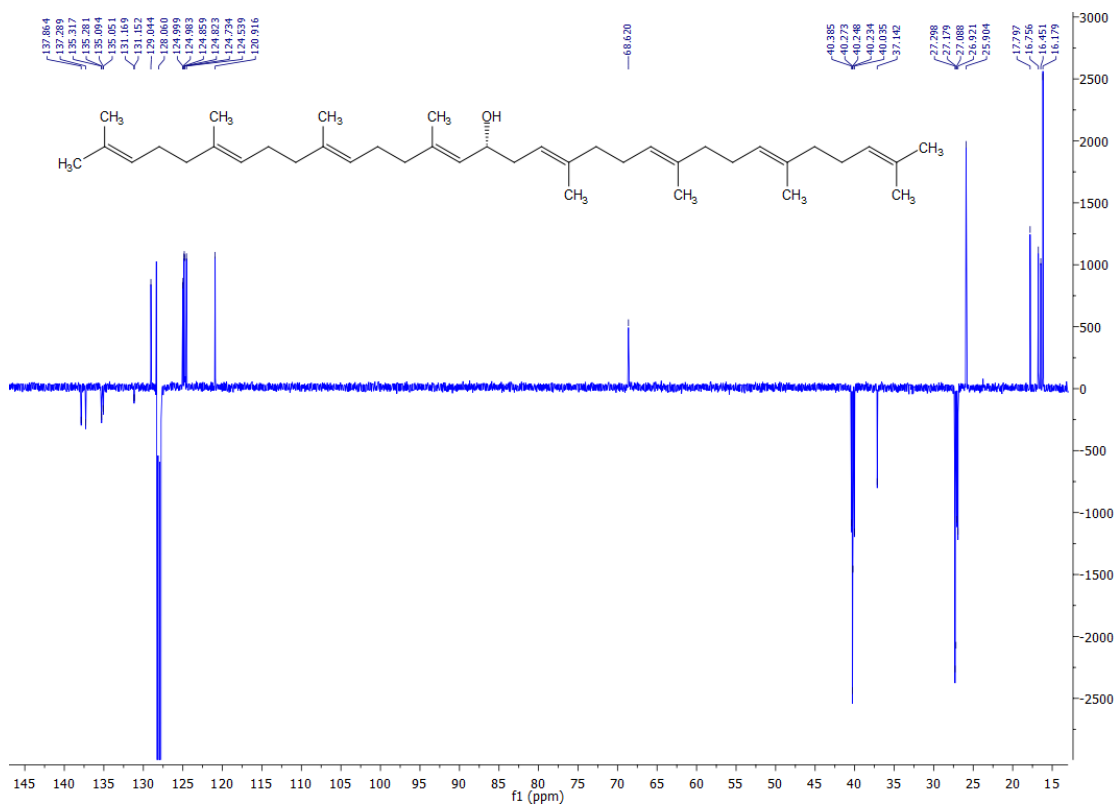
Espectro 3. RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de 5-(3'',4''-diacetoxy-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**).



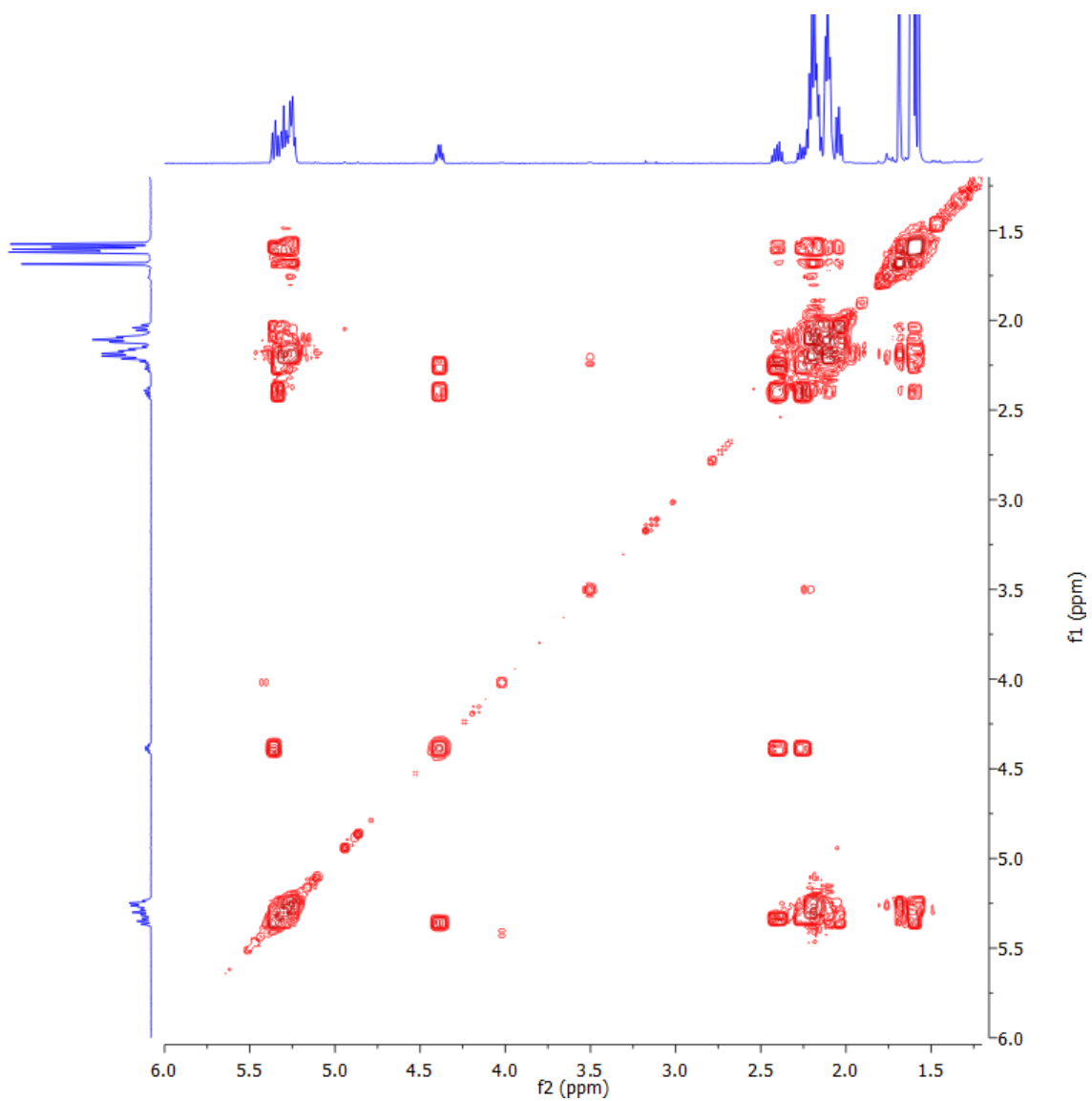
Espectro 4. HSQC (500 MHz, CDCl_3) de 5-(3'',4''-diacetoxy-1''-butinil)-2,2'-bitiofeno (**3**).



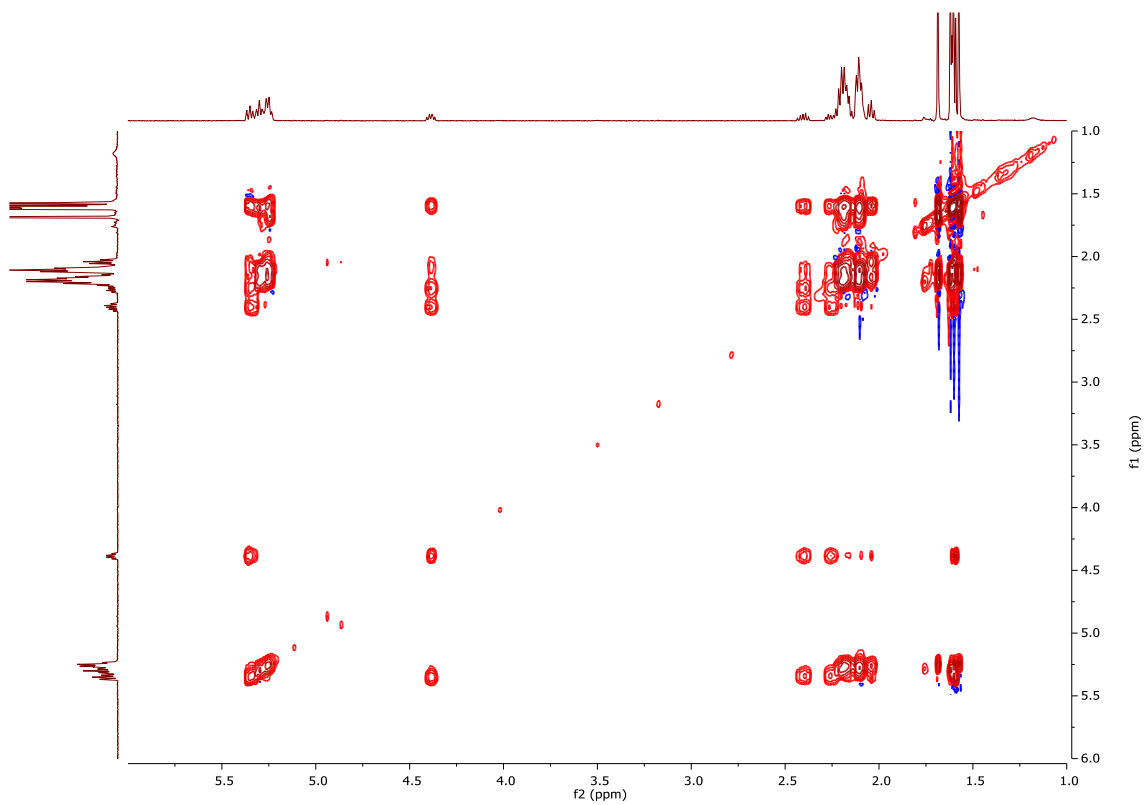
Espectro 5. RMN ^1H (500 MHz, benceno- d_6) de 16-hidroxi-licoperseno (4).



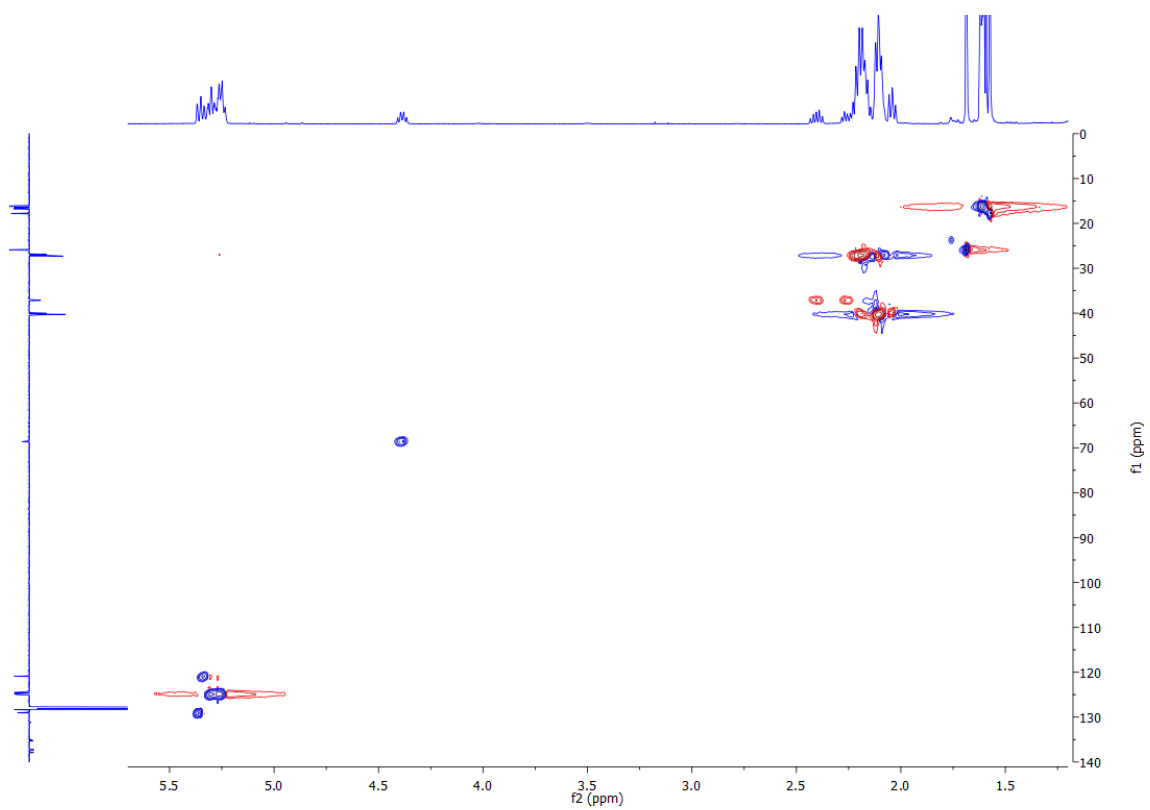
Espectro 6. RMN ¹³C (500 MHz, benceno-d₆) de 16-hidroxi-licoperseno (4).



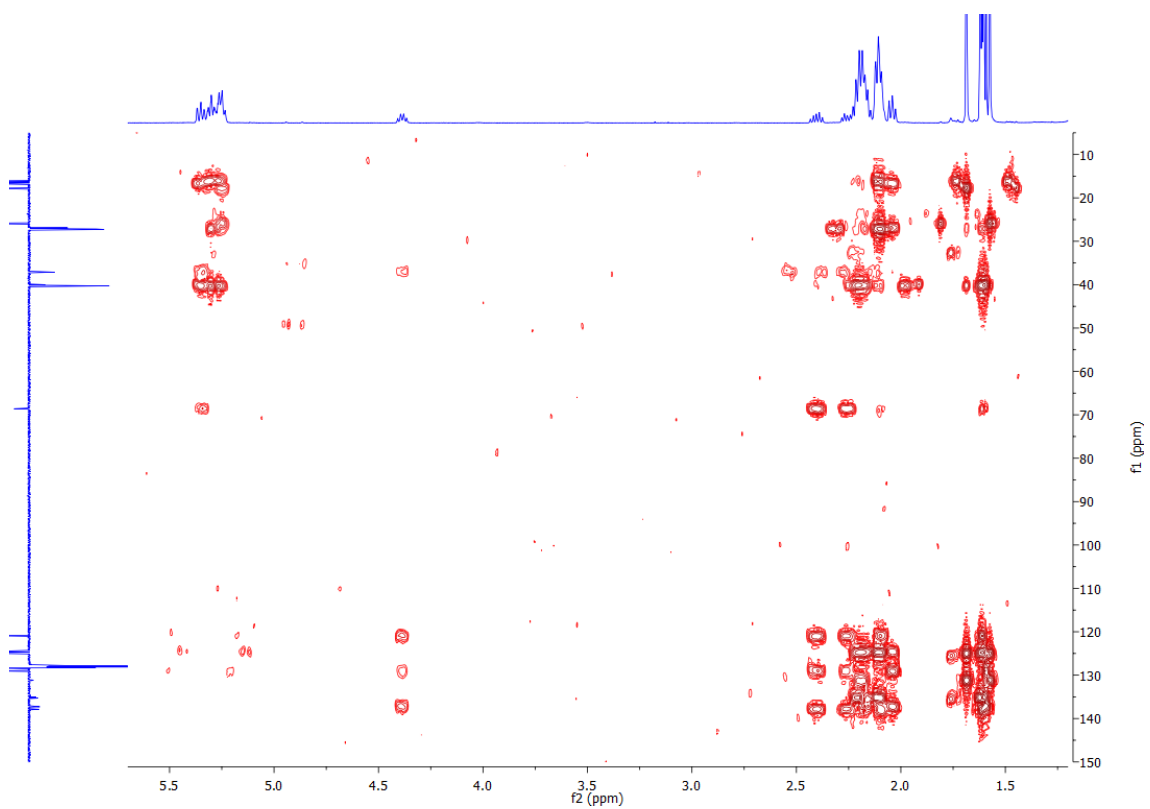
Espectro 7. COSY ^1H - ^1H (benceno- d_6) de 16-hidroxi-licoperseno (**4**).



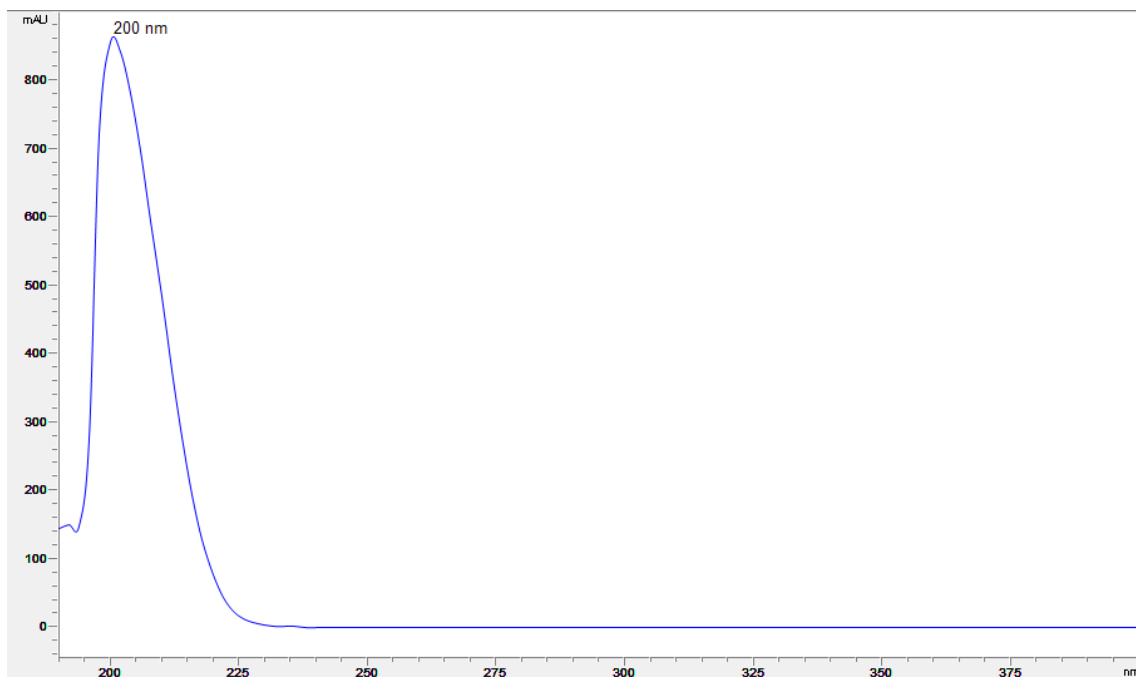
Espectro 8. TOCSY (benceno-d₆) de 16-hidroxi-licoperseno (**4**).



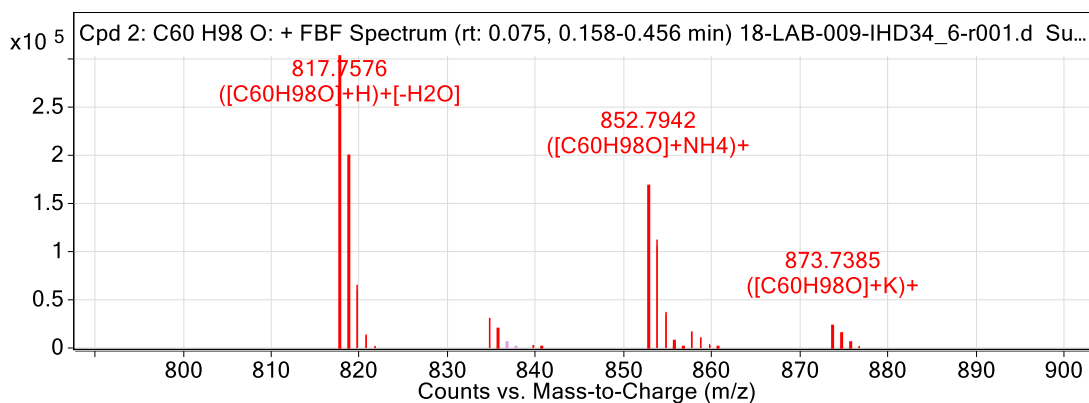
Espectro 9. HSQC (benceno-d₆) de 16-hidroxi-licoperseno (4).



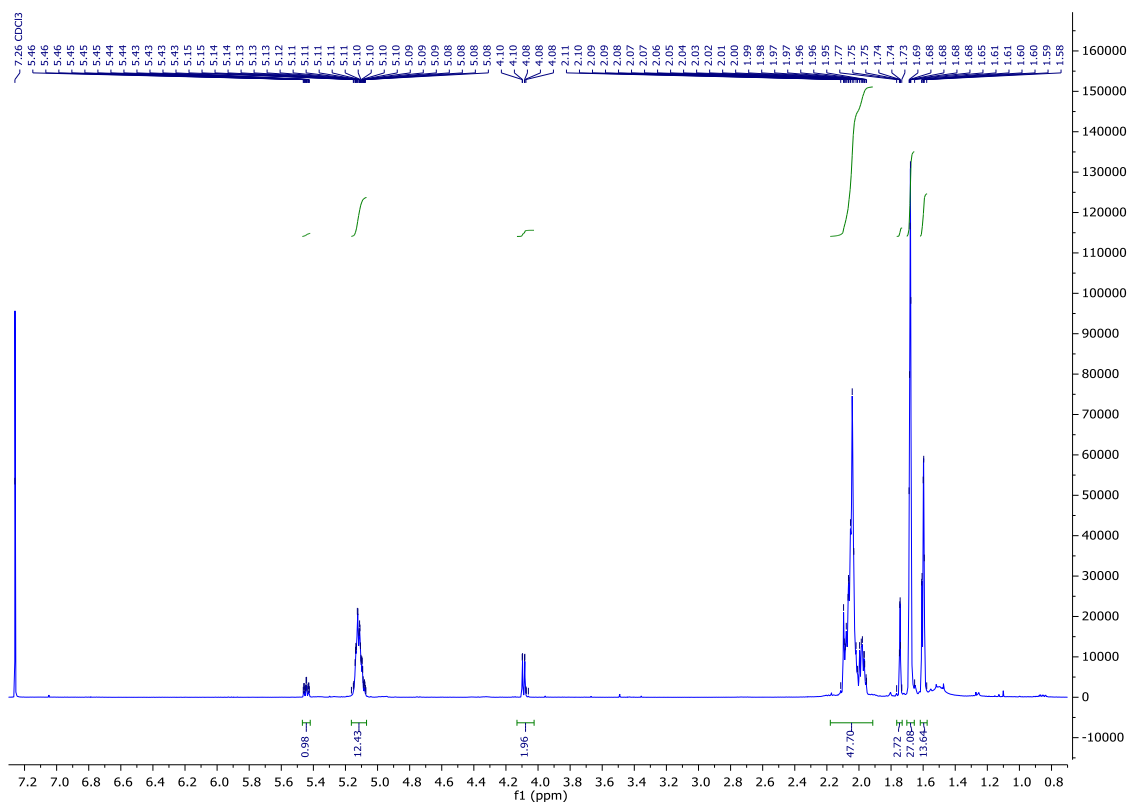
Espectro 10. HMBC (benceno-d₆) de 16-hidroxi-licoperseno (4).



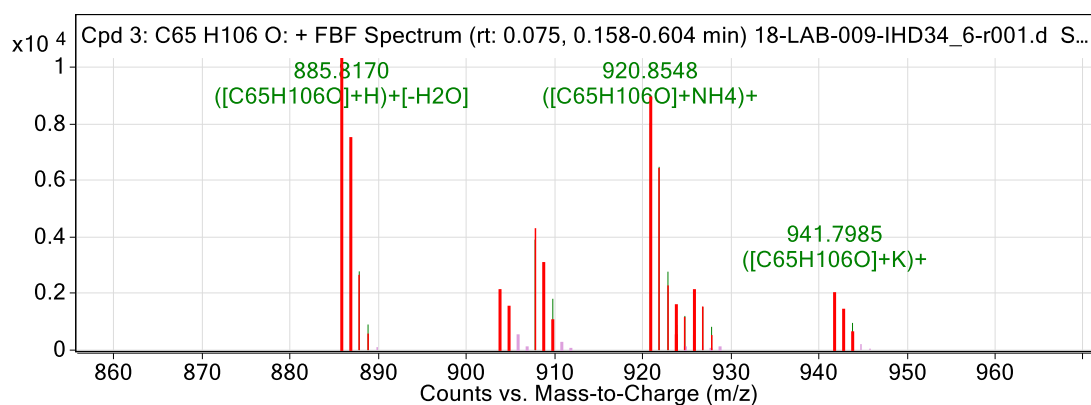
Espectro 11. UV de 16-hidroxi-licoperseno (4).



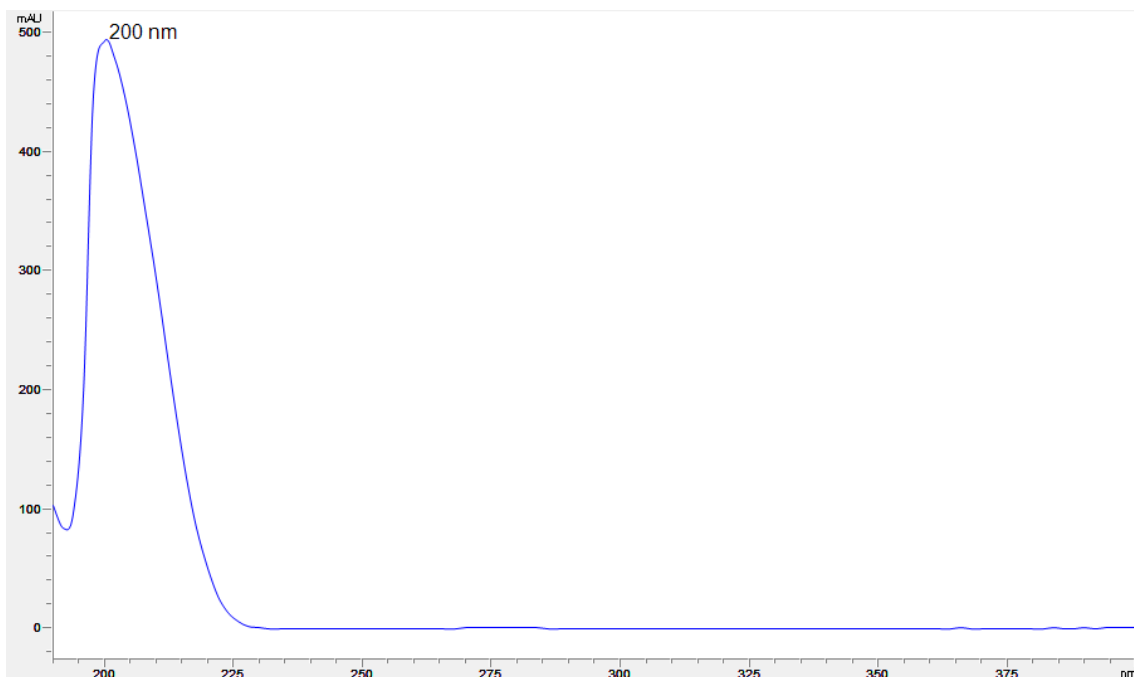
Espectro 12. Masas de alta resolución por la técnica ESI/Q-TOF correspondiente al compuesto (Z_8, E_3, ω) -dodecaprenol (5).



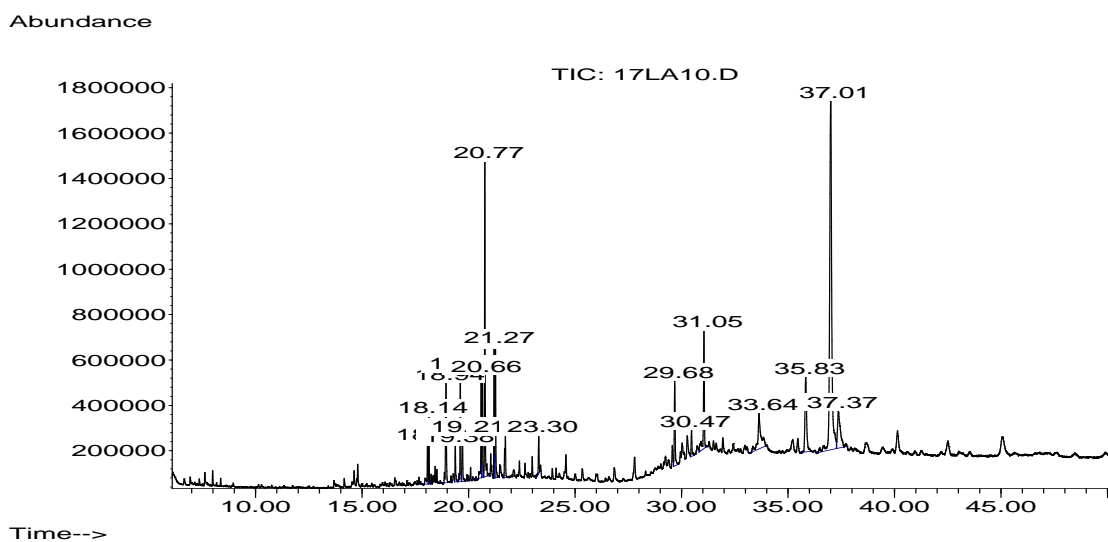
Espectro 15. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de (Z₉,E₃,ω)-tridecaprenol (**6**).



Espectro 16. Masas de alta resolución por la técnica ESI/Q-TOF correspondiente al compuesto (Z₉,E₃,ω)-tridecaprenol (**6**).



Espectro 17. UV de (Z_8, E_3, ω)-tridecaprenol (**6**).



Cromatograma 1. Cromatograma de gases del extracto de hexano de las hojas de *T. hirsutissima*. Los picos con tiempos de retención de 20.77 y 37.01 min corresponden al fitol y el sitosterol, respectivamente.