

Extracción y caracterización estructural de moléculas bioactivas en cáncer de próstata obtenidas de plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya

Bach. Juan Manuel Trinidad Barnech

Dr. Guzmán Álvarez (Tutor)

Lic. Rafael Fort (co-tutor)

Laboratorios de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte Sede Paysandú.

Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Noviembre 2018

Resumen

El cáncer de próstata es el cáncer más común en los hombres de todo el mundo. Es una enfermedad compleja y heterogénea en la que los andrógenos y sus receptores desempeñan un papel crucial en la progresión y el desarrollo. El tratamiento actual para el cáncer de próstata es una combinación de cirugía, terapia hormonal, radiación y quimioterapia. Los agentes terapéuticos comúnmente utilizados en la clínica incluyen anti-andrógenos esteroideos y no esteroideos, como el acetato de ciproterona, bicalutamida y enzalutamida. Estos pocos agentes tienen múltiples efectos adversos y no son 100% efectivos. Se ha demostrado que varios compuestos y mezclas de plantas, incluidos extractos de polifenol de semilla de uva, preparaciones de licopeno de tomate, isoflavonas de soja y extractos de té verde, son eficaces contra el crecimiento de células de cáncer de próstata. La actividad antineoplásica *in vivo* de algunos compuestos aislados como la capsaicina y la curcumina fue reportada en modelos murinos de cáncer de próstata. En este trabajo preparamos una biblioteca de extractos de plantas de la medicina tradicional maya. Las plantas utilizadas fueron seleccionadas en base a su uso en las comunidades mayas contemporáneas para el tratamiento de diferentes enfermedades. Los diferentes extractos se evaluaron mediante ensayo de MTT a dosis fija de 25 µg/ml utilizando una línea celular de cáncer de próstata sensible a andrógenos (LNCaP). El ensayo MTT identificó a siete de las diez plantas con una actividad antineoplásica significativa. Los extractos de estas plantas se sometieron a un fraccionamiento bioguiado para estudiar sus componentes principales. Identificamos tres compuestos con efectos antineoplásicos contra las células LNCaP, uno de los cuales

muestra selectividad para las células neoplásicas en comparación con las células benignas.

La investigación realizada en el contexto de esta tesis fue publicada en la revista arbitrada *Pharmaceuticals* (DOI: 10.3390/ph11030078) (Fort & Trinidad *et al.* 2018).

Abreviaturas

CaPr	Cáncer de Próstata
CMCaPr	Células Metastásicas de CaP
COSY	Acrónimo del inglés Correlation Spectroscopy
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMBC	Acrónimo del inglés Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Acrónimo del inglés Heteronuclear Single Quantum Correlation
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio
PA	Privación de Andrógeno
PBS	Acrónimo del inglés phosphate-buffered saline
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por Minuto
RTX	Resiniferatoxina
SFB	Suero Fetal Bovino
TEM	Transición de célula epitelial a mesenquimal
TLC	Cromatografía en capa fina o preparativa
LNCaP	Línea celular humana derivada de carcinoma de próstata
TRPV1	Acrónimo del inglés Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 1

Índice

Extracción y caracterización estructural de moléculas bioactivas en cáncer de próstata obtenidas de plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya.	0
Resumen	1
Abreviaturas	2
Introducción	5
Cáncer	5
Cáncer de Próstata	7
Resumen de la bibliografía pertinente en etnobotánica	11
Antecedentes de las plantas utilizadas en la investigación	13
Objetivo principal	17
Objetivos Específicos	17
Materiales y Métodos	17
Cultivo Celular	17
Medio de cultivo	17
Descomplementación del Suero Fetal Bovino (SFB)	18
Descongelado de crioviales	18
Mantenimiento del cultivo	18
Subcultivo o Repique de la monocapa de células	19
Recuento en cámara de Neubauer	19
Congelado de células en crioviales	20
Fraccionamiento bioguiado	21
Caracterización molecular por RMN	23
Test estadístico	25
Resultados	26
Evaluación de la citotoxicidad de las extracciones Iniciales metanólicas y diclorometánicas 26	
Fraccionamiento por Columna de Sílica de los extractos activos seleccionados	27
Subfraccionamiento por cromatografía preparativa de las fracciones seleccionadas provenientes de las cromatografías por columna de sílica.	32
Caracterización estructural por RMN ¹ H, COSY, HMBC y HSQC	35
<i>Leucaena leucocephala</i> (T2 F29 Fp10)	35
<i>Cnidocolus chayamansa</i> (T3 F5-8 Fp9)	36

<i>Capsicum chinense</i> (T31 F0 Fp5).....	37
<i>Capsicum chinense</i> (T31 F11 Fp9ss).....	39
Ensayo de selectividad en diferentes líneas celulares de próstata.....	41
Discusión.....	45
<i>Leucaena leucocephala</i> (T2).....	45
Cromatografía en columna de sílica.....	45
Cromatografía preparativa.....	45
<i>Cnidoscolus chayamansa</i> (T3).....	46
Cromatografía en columna de sílica.....	46
Cromatografía preparativa.....	47
Caracterización estructural por RMN ¹ H, COSY, HMBC y HSQC.....	47
<i>Terminalia catappa</i> (T6).....	48
Cromatografía en columna de sílica.....	48
<i>Capsicum chinense</i> (T31).....	49
Cromatografía en columna de sílica.....	49
Cromatografía preparativa.....	50
Caracterización estructural por RMN ¹ H, COSY, HMBC y HSQC.....	50
Selectividad e IC50s.....	54
Conclusiones.....	56
Perspectivas.....	58
Bibliografía.....	58
Anexo.....	65
Financiación.....	72
Agradecimientos.....	72

Introducción

Cáncer

El cáncer constituye una de las mayores preocupaciones sanitarias a nivel mundial. En 2012 se registraron 8.2 millones de muertes a causa de esta enfermedad donde el conjunto de países en vías de desarrollo como Uruguay aportan el 65% de esta cifra (Torre *et al.* 2015). La ocurrencia de este fenómeno se encuentra en aumento, debido al crecimiento y envejecimiento poblacional, al aumento en la incidencia del sobrepeso y a la práctica de hábitos como el tabaquismo y el sedentarismo. Dentro de los distintos tipos de cáncer el que alcanza un mayor registro de mortalidad es el de pulmón. Si bien en el caso del sexo masculino la mortalidad es indistinta respecto al nivel de desarrollo del país, en el caso de las mujeres se encuentra con mayor frecuencia en los países más desarrollados conformando aproximadamente la mitad de los casos diagnosticados y el 38% de las muertes (Torre *et al.* 2015).

Se denomina “cáncer” a un conjunto de patologías malignas proliferativas, caracterizado por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular (Hanahan *et al.* 2011). Los genes implicados en la división celular son la base del desarrollo de esta patología. Existen dos componentes principales en el desarrollo de la enfermedad: uno es hereditario, es decir, que existan mutaciones deletéreas en los parentales en la secuencia de genes que predisponen a la enfermedad, o esporádico donde se producen mutaciones espontáneas generadas por factores ambientales, siendo estos últimos los más comunes en el desarrollo de la enfermedad (Torre *et al.* 2015, Hanahan *et al.* 2011, Leon *et al.* 1987).

Naturalmente y mediante procesos sumamente controlados, las células de un organismo crecen y se dividen para mantener y renovar los tejidos. Cuando estas se dañan o envejecen, mueren, y son reemplazadas por células producidas por una división reciente. Sin embargo, en el cáncer, este proceso se descontrola y se generan nuevas

células cuando no deberían. Estas se dividen sin interrupción y forman masas celulares denominadas tumores (Pistollato *et al.* 2015).

Los tumores, además de ser un cúmulo de células creciendo indefinidamente, son un tejido complejo compuesto por muchos tipos celulares que participan en interacciones heterotípicas que potencian, por ejemplo, la invasión (Hanahan *et al.* 2011). Existen dos formas de clasificación de los tumores basadas en la agresividad de la expansión celular: si el tumor se encuentra localizado y no ha invadido otros tejidos es denominado “benigno”, mientras que el tumor que ha logrado invadir tejidos cercanos generando metástasis se lo denomina “maligno” (Weingberg *et al.* 2007).

Todos los tipos de cáncer comparten 6 características distintivas o “hallmarks” que deben tenerse en cuenta para comprender a nivel general la patología y distinguir su comportamiento del de una célula normal. Estas características son: autosuficiencia en el desarrollo de señales de crecimiento y mantenimiento de señales de proliferación, evasión de las señales antiproliferativas, activación y adquisición de capacidad invasiva (metástasis), desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal, inducción de la angiogénesis y resistencia a la muerte celular (FIG 1) (Hanahan *et al.* 2012).

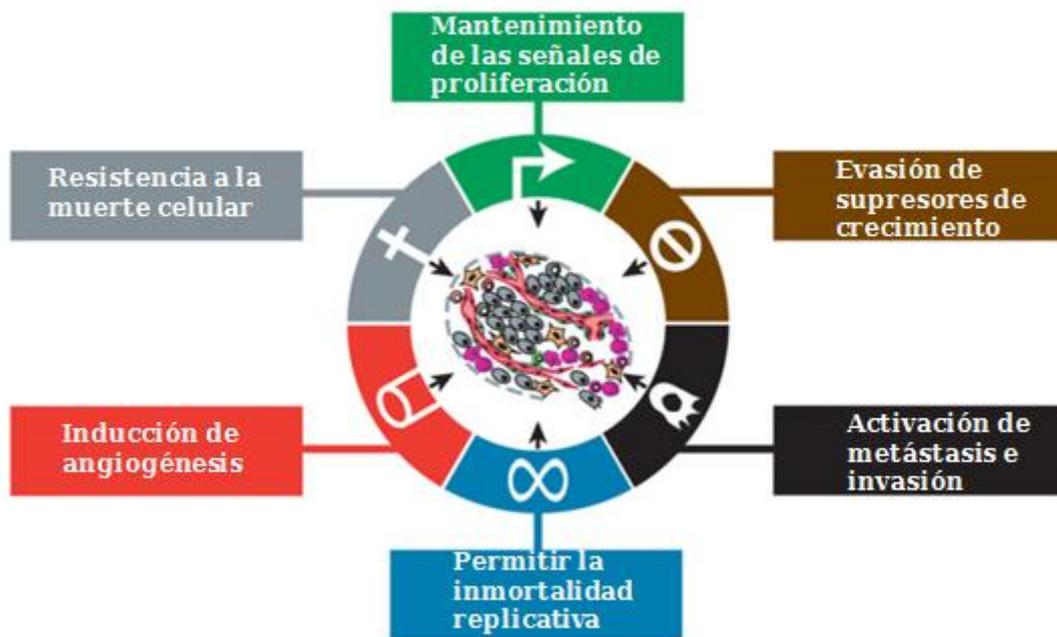


FIG 1 Resumen ilustrativo de las 6 características distintivas o “hallmarks” del cáncer. Imagen adaptada de Hanahan *et al.* 2011.

Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (CaPr) en las estadísticas mundiales aparece como el segundo más frecuente en hombres, con 1.1 millones de casos nuevos estimados en 2012 (FIG 2) (Torre *et al.* 2015). No obstante, en los países más desarrollados y en Uruguay ocupa el primer puesto en los diagnósticos (incidencia) de cáncer dentro del sexo masculino (FIG 3).

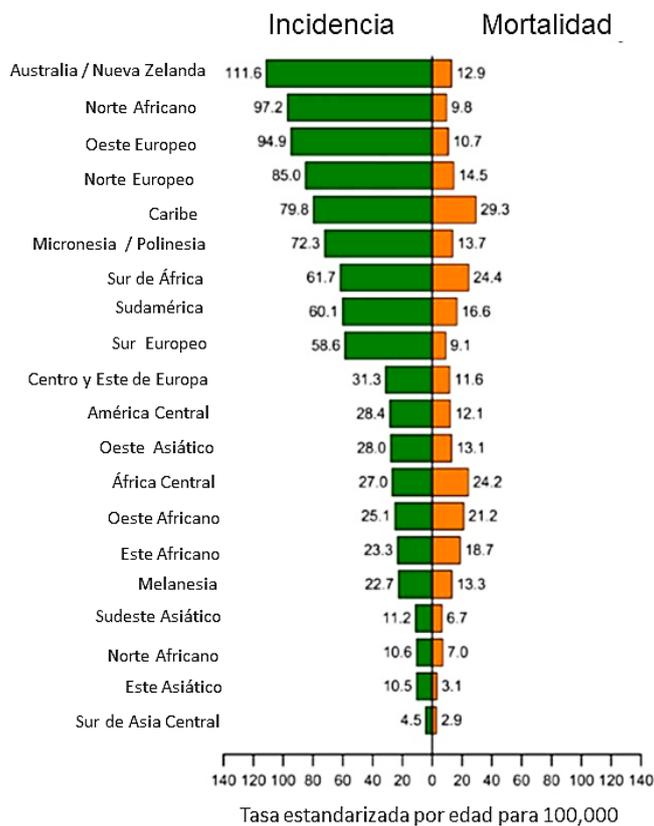


FIG 2 Índice y tasa de Mortalidad del cáncer de próstata en diferentes partes del mundo. Imagen modificada de Torre *et al.* 2015.

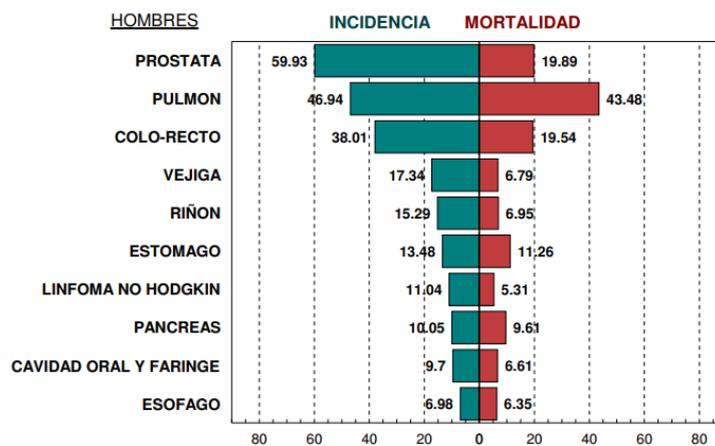


FIG 3 Índice y tasa de Mortalidad de cáncer en hombres uruguayos. Tasa estandarizada por edad, población mundial estándar (casos por 100,000). Imagen tomada de Sánchez *et al.* 2013.

El CaPr es actualmente reconocido como una enfermedad multifactorial. A pesar de que se reconoce un aporte ambiental, la predisposición genética cumple un rol importante en su desarrollo. Hoy en día se conocen las bases genéticas de herencia familiar con la identificación de mutaciones raras, pero de alto riesgo (ej. BRCA2, HOXB13, CHEK2) y alelos comunes de bajo riesgo (Attard *et al.* 2015).

Gran número de genomas de CaPr han sido secuenciados. Éstos se caracterizan por mutaciones puntuales de ganancia o pérdida de material en los cromosomas, además de presentar una baja tasa de mutaciones. SPOP, que codifica para una subunidad de *Cullin-based E3 ubiquitin ligasa*, TP53 y PTEN son los genes que se encuentran mutados más frecuentemente según estudios en CaPr localizado (Attard *et al.* 2015). Se han identificados siete subtipos moleculares en CaPr, las mutaciones más comunes suelen ser fusiones en los genes de la familia ETS (*E26 transformation-specific*) con promotores regulados por el receptor de andrógeno. Dichas fusiones definen cuatro subtipos moleculares: ERG, ETV1, ETV4, y FLI1, siendo estos los genes involucrados. Los restantes tres grupos se caracterizan por poseer mutaciones en los genes SPOP, FOXA1, y IDH1, definiendo cada uno de estos una categoría (Abeshouse *et al.* 2015).

El origen tisular de este tipo de cáncer parece ser las células luminales y epiteliales, aunque aún es controversial. También se especula que puede ser una evolución de las células basales iniciales neoplásicas hacia un adenocarcinoma, mantenidas por células *luminal-like* (Goldstein *et al.* 2010, Miyahira *et al.* 2016, Wang *et al.* 2009).

El pronóstico para un portador de cualquier tipo de cáncer se define por la presencia o ausencia de metástasis (Bubendorf *et al.* 2000). Un cáncer se vuelve metastásico cuando las células neoplásicas logran migrar (generalmente por vía sanguínea o linfática) a diferentes tejidos desencadenando tumores en los que logre “colonizar”. El evento de colonización no es simple para la célula metastásica debido a que requiere un ambiente de señalización propicio para su desarrollo y multiplicación, entre otra gran cantidad de variables (Weingberg *et al.* 2007). Actualmente, se conocen los genes implicados en la metástasis y son clasificados en tres categorías según su contribución en el desarrollo.

Los genes implicados en invasión e intravasación son denominados *Metastasis initiation genes*. En la categoría *Metastasis progression genes* se encuentran los genes de función dual que median la tumorigénesis primaria y la colonización de otros tejidos. Por último, se encuentran los genes involucrados exclusivamente en la invasión de órganos distantes en la clasificación *Metastasis virulence genes* (Nguyen *et al.* 2007).

En el caso de CaPr los lugares más frecuentes de invasión son el tejido óseo (caracterizado por las lesiones osteoblásticas) y los ganglios linfáticos (Bubendorf *et al.* 2000). La inestabilidad genómica es necesaria para la metástasis del CaPr. La combinación entre la pérdida de función del gen PTEN y la ganancia en número de copias de MYC son las variaciones genéticas que contribuyen a esta inestabilidad y conducen a metástasis en CaPr que suele ser letal en los pacientes (Miyahira *et al.* 2016).

Desde un enfoque molecular, en las primeras etapas las células metastásicas de CaPr (CMCaPr) son caracterizadas por la gran expresión de genes embrionarios (*stemness*), anti-apoptóticos, de quiescencia y genes implicados en la transición de célula epitelial a mesenquimal (TEM). También está documentado un descenso en la expresión de genes luminales (Miyahira *et al.* 2016). En los estadios más terminales de las CMCaPr la expresión se vuelve similar a las células parentales, es decir, a las neoplásicas localizadas que dieron lugar a las metastásicas, y se caracteriza por altos niveles de expresión de genes luminales (Miyahira *et al.* 2016).

A pesar de los avances en investigación del CaPr, el éxito de los tratamientos para pacientes con enfermedad avanzada, es decir en situación metastásica, ha cambiado poco. A lo largo de la última década el tratamiento utilizado por excelencia es la privación de andrógeno (PA), que, a su vez, tiene importantes efectos secundarios en la esperanza y calidad de vida de las personas tratadas. A los pacientes con oligo-metástasis (metástasis con poco desarrollo) además de tratarlos con PA se los trata de forma directa con cirugías o radioterapia brindando mejores resultados que las personas con una metástasis ampliamente desarrollada (Ost *et al.* 2015).

De la evidencia antes expuesta surge la necesidad de investigación innovadora en el área de farmacoterápicos que contrarresten la patología más selectivamente y sin dismantelar el funcionamiento “normal” del organismo, es decir, disminuir cualquier tipo de efecto secundario. Para esto se pueden abordar diferentes estrategias, de las cuales el diseño racional es de las más utilizadas. Dentro de ésta se pueden buscar moléculas con potencial actividad antineoplásica entre material de origen natural, como por ejemplo las plantas, dado que la naturaleza es la fuente más abundante y diversa de sustancias químicas.

Resumen de la bibliografía pertinente en etnobotánica

Desde la antigüedad la medicina popular ha utilizado los recursos naturales como herramientas para resolver problemas de la salud. El conocimiento sobre el potencial farmacológico de hierbas, plantas, flores, hojas, árboles, semillas, aceites y raíces puede ser rastreado hacia el pasado llegando hasta la medicina antigua Egipcia, Musulmana, India, China y Europea, entre otras (Teiten *et al.* 2013).

Diversas investigaciones han demostrado que las plantas son fuentes de metabolitos de potente actividad farmacológica, por ejemplo, curcumina, taxol, birsonimadiol y capsaicina, entre otros (Kaewpiboon *et al.* 2012, Pérez *et al.* 2016, Zheng *et al.* 2015). Una vez aislados, dichos metabolitos pueden ser modificados con el fin de mejorar sus propiedades como fármaco.

Camptotheca acuminata es un árbol ornamental chino del cual se extrajo camptotecina, una molécula que mediante modificaciones químicas dio lugar a compuestos semisintéticos como el totecán y el irinotecán de uso actual en quimioterapia (utilizado intravenoso, generalmente en casos de metástasis). Totecán es utilizado en casos de cáncer de ovario y pulmón, mientras que irinotecán en cáncer colorrectal. Otras moléculas de uso clínico son los derivados semi-sintéticos de epipodofilotoxina

(molécula extraída de la raíz de *Podophyllum peltatum*), Etopósido y Tenipósido. Estos son utilizados en linfomas, cánceres bronquiales y testiculares (Cragg *et al.* 2005).

La mezcla de moléculas extraídas de plantas ha sido utilizada exitosamente en China, tal es el caso de Homoharringtonina y Harringtonina en casos de leucemia mielógena aguda y leucemia mielógena crónica (FIG 4) (Cragg *et al.* 2005).

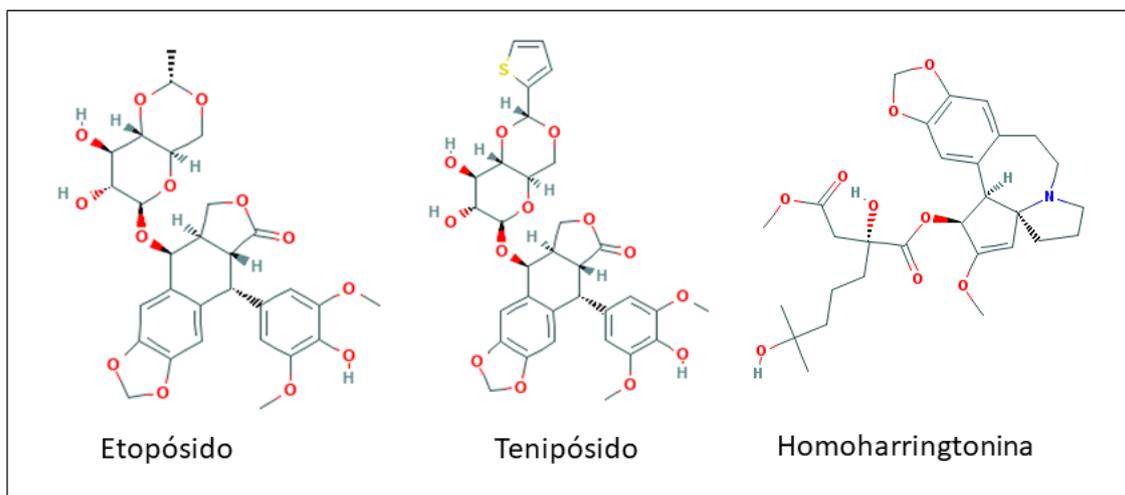


FIG 4 Moléculas antineoplásicas utilizadas en la clínica.

Cuando el CaPr se encuentra en etapas avanzadas, en la clínica se suele recurrir a la quimioterapia. Dentro de este abordaje uno de los fármacos más utilizados es el Docetaxel y Cabazitaxel, derivados sintéticos de Taxol (FIG 5) (Bono *et al.* 2010). El Taxol fue aislado en 1971 de la corteza del tallo de la planta *Taxus brevifolia* aunque también se ha aislado de distintos órganos y plantas del mismo género.

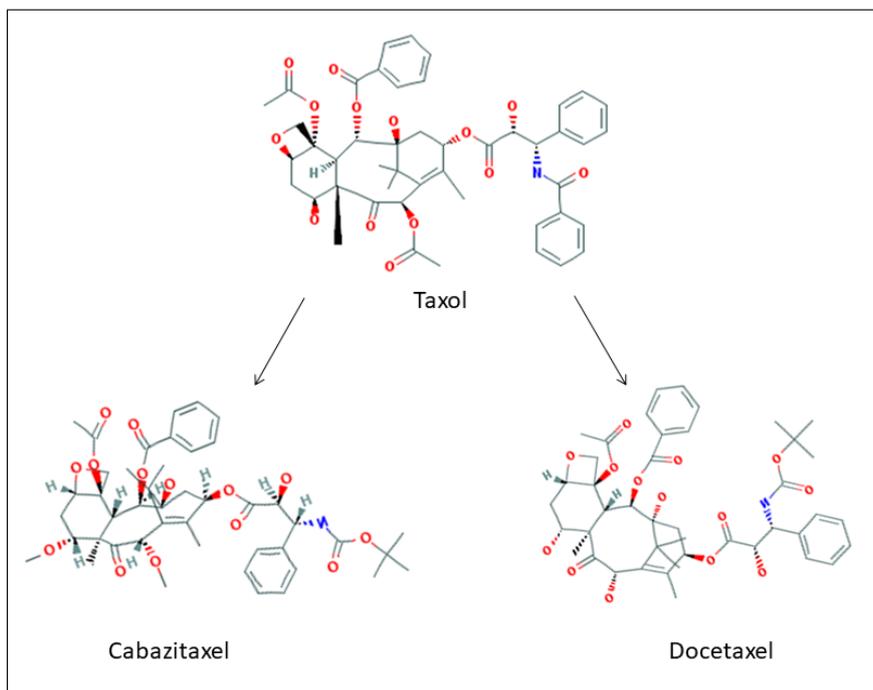


FIG 5 Moléculas antineoplásicas derivadas del Taxol utilizadas en la clínica.

Otros compuestos derivados de plantas demostraron tener actividad antineoplásica en líneas celulares prostáticas primarias y metastásicas, modulando fenotipos como migración e invasión (Wang *et al.* 2018). Éstos son solo algunos ejemplos de moléculas de origen natural que fueron o son utilizadas en la clínica de distintos tipos de cáncer. Esto demuestra que los productos naturales (moléculas de origen natural) son siempre una alternativa para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, dado que la diversidad biológica siempre se traduce en una diversidad química de base.

Antecedentes de las plantas utilizadas en la investigación

En esta investigación partimos de una extractoteca de 10 plantas del sureste de México (región Caribe) (Tabla 1). Estas plantas fueron seleccionadas según indicaciones de los médicos tradicionales (chamanes) de la cultura Maya contemporánea y luego clasificadas taxonómicamente por botánicos.

Tabla 1

Nombre común	Nombre científico	Ubicación	Fecha de colección	Región de la planta utilizada	Extracto MeOH (g)	Extracto CH ₂ Cl ₂ (g)	Muestra inicial (g)	Rendimiento de la extracción %
Bejuco de playa	<i>Ipomoea pes-caprae</i>	Playa de Tulum (20°11'52.00" N; 87°26'12.38" O)	may-14	Hojas y ramas	20,2 (T25)*	2,4 (T33)	132	17
Nance	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Parque Ecológico Chetumal (18°30'21.25" N; 88°19'12.79" O)	sep-13	corteza	35,5 (T27)	12,6 (T28)	200	24
Uva de mar	<i>Coccoloba uvifera</i>	Bahía Chetumal (18°31'1.79" N; 88°16'14.46" O)	may-14	Hojas	40,0 (T24)	4 (T23)	214	21
Almendro	<i>Terminalia catappa</i>	Ciudad de Chetumal (18°31'0.55" N; 88°18'50.27" O)	may-14	Hojas	27,9 (T13)	9 (T6)	250	15
Elemuy	<i>Malmea depressa</i>	Santa Rosa (19°57'51.90" N; 88°16'17.00" O)	may-14	Hojas y ramas	25,6 (T19)	4	164	18
Elemuy	<i>Malmea depressa</i>	Santa Rosa (19°57'51.90" N; 88°16'17.00" O)	may-14	Raíz	9,5 (T20)	2,6 (T21)	187	6
Huachi	<i>Leucaena leucocephala</i>	Ciudad Chetumal (18°31'17.48" N; 88°18'47.94" O)	may-14	Hojas y ramas	26,8 (T2)	9 (T8)	273	13
Chaya	<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Ciudad Chetumal (18°31'0.55" N; 88°18'50.27" O)	may-14	Hojas	16,7 (T3)	2 (T4)	100	19
Guarumbo	<i>Cecropia obtusifolia</i>	Ciudad Chetumal (18°31'26.60" N; 88°18'49.84" O)	may-14	Hojas	16,7 (T5)	4,5 (T22)	150	14
Tsutsup	<i>Helicteres baruensis Jacq</i>	Playa Tulum (20°11'59.42" N; 87°26'53.68" O)	may-14	Hojas y ramas	10,6 (T11)	6 (T14)	113	15
Chile habanero	<i>Capsicum chinense</i>	F. Carrillo Puerto (19°34'50.49" N; 88° 2'39.57" O)	may-14	Fruto	11,3 (T31)	5 (T38)	55	21

Entre las plantas seleccionadas se encuentra *Cnidoscolus chayamansa* comúnmente conocida como “Chaya”, una de las que poseen mayor cantidad de bibliografía publicada. En las líneas celulares bacterianas TA100 y TA98, esta presenta actividad antimutagénica (Loarca-Piña *et al.* 2010). Además, según el ensayo de isquemia-reperfusión (*ischemia-reperfusion assay*) en ratones existe una actividad antiinflamatoria y se obtuvieron resultados relevantes en los ensayos de capacidad antioxidante (*ORAC assay*, *DPPH method*) (Kuti *et al.* 2004, García-Rodríguez *et al.* 2014). Estos efectos pueden ser posibles propiedades profilácticas o terapéuticas frente al tratamiento del cáncer (Gorrini *et al.* 2013).

Birsonimadiol es un fármaco anti-inflamatorio aislado de las hojas de *Byrsonima crassifolia*, una planta utilizada por los indígenas mexicanos que influye sobre más de una ruta biológica. Algunas de las moléculas afectadas por el fármaco son: el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (*TNF-alpha*, por sus siglas en inglés) y la citoquina interleukina 6 (*IL-6*), el efecto encontrado es la inhibición de ambas (Pérez *et al.* 2016). Puesto que IL-

6 es un regulador importante de la progresión del CaPr (Nguyen *et al.* 2014) la inhibición antes mencionadas posicionan al extracto orgánico de *Byrsonima crassifolia* como un posible candidato para el tratamiento de esta patología desde un punto de vista sistémico del organismo.

Algunas de las plantas seleccionadas ya fueron ensayadas en distintos tipos de líneas celulares cancerígenas, por ejemplo: *Leucaena leucocephala* (planta arbórea del género de las Leguminosas) y *Malmea depressa* también conocida como “Elemuy” por la cultura Maya. La primera tuvo efectos antiproliferativos en la línea celular HT-29 (carcinoma de colon humano), HeLa (carcinoma de cervical humano), HepG3 (carcinoma de hígado humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), siendo esta última la más afectada por el extracto. Los efectos son atribuidos a sus taninos condensados (Zarin *et al.* 2016). En el caso de *M. depressa* se constató un efecto inhibitorio del crecimiento en las líneas celulares HT-29 (carcinoma de colon humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) y A549 (carcinoma de pulmón humano) (Gutierrez-Lugo *et al.* 1996).

Los ensayos realizados con *Ipomoea pes-caprae* en ratones (B16F10) con melanoma resultaron en una disminución del crecimiento tumoral lo que la posiciona como posible tratamiento complementario a la radioterapia (Manigauha *et al.* 2015).

La capsaicina es la molécula que produce la sensación de ardor en los picantes del género *Capsicum spp.* Su actividad en células cancerígenas se resume en la FIG 6. Diversos mecanismos han sido propuestos y actualmente se encuentran siete moléculas derivadas en ensayos clínicos vinculados al cáncer; tres finalizados, tres en curso, y uno sin datos de desarrollo según la página del NIH (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=capsaicin&cntry=&state=&city=&dist=>). En nuestra extractoteca se encuentra *Capsicum chinense* comúnmente conocida como chile habanero, una de las especies más picantes dentro del género.

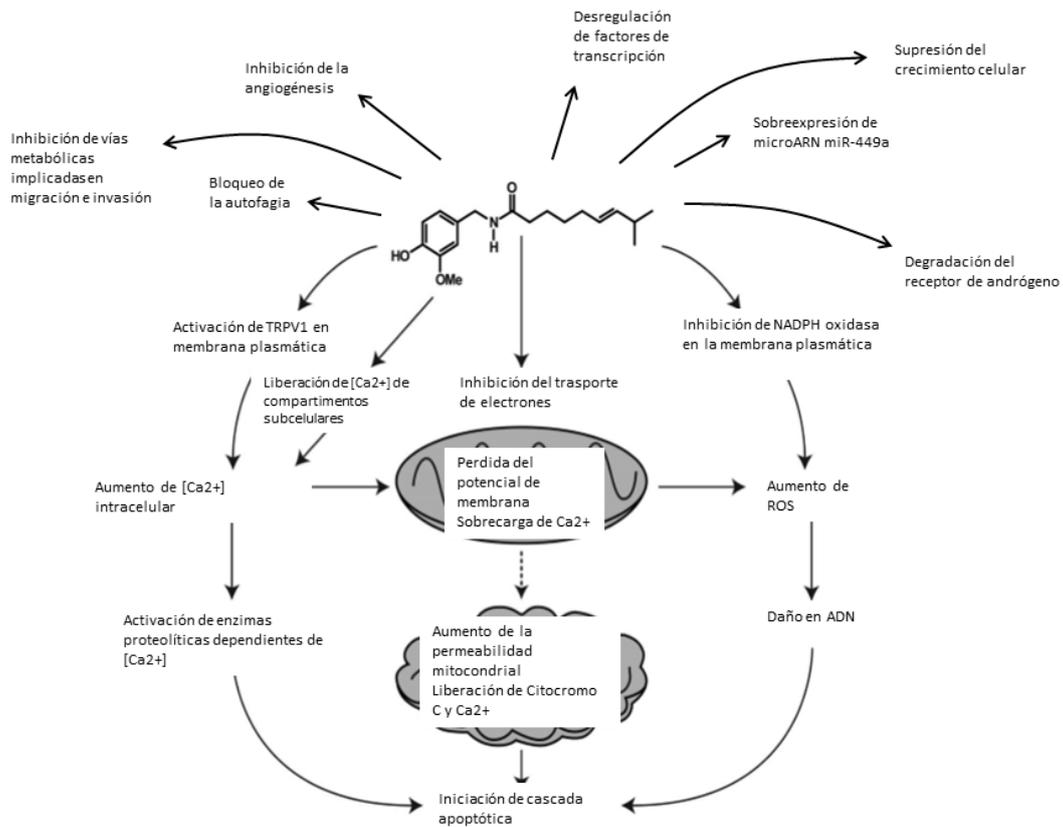


FIG 6 Resumen de los mecanismos en los que se ha descrito participación de la capsaicina en el CaPr. La imagen fue tomada de Bley *et al.* 2012 con algunas modificaciones basadas en Zheng *et al.* 2015, Ramos-Torres *et al.* 2016 y Clark *et al.* 2016.

Terminalia catappa es una planta tropical y subtropical ampliamente utilizada en la medicina popular, algunos autores proponen un abordaje más profundo de sus propiedades dado que el extracto etanólico de sus hojas ha demostrado disminuir la invasión en líneas celulares metastásicas de cáncer oral y de pulmón (Chu *et al.* 2007, Bley *et al.* 2012).

Las únicas plantas de la extractoteca que no presentan bibliografía relacionada con algún tipo de cáncer son: *Helicteres baruensis*, *Coccoloba uvifera* y *Cecropia obtusifolia*.

Objetivo principal

- Caracterizar la actividad antineoplásica *in vitro* de 10 plantas de uso común en la medicina tradicional Maya.

Objetivos Específicos

- Realizar fraccionamiento bioguiado de los extractos derivados de las 10 especies de plantas.
- Evaluar los extractos de plantas mediante ensayos de MTT en una línea celular tumoral modelo de cáncer de próstata.
- Aislar e identificar las moléculas implicadas en la actividad citotóxica en el modelo de estudio de cáncer de próstata.

Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Medio de cultivo

Para el cultivo de las líneas celulares LNCaP, BPH-1, DU145 y PC3, se utiliza el medio de cultivo comercial RPMI 1640 con Glutamina estable complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) descomplementado, 1% de Penicilina (100 U/mL) y Estreptomicina (100 µg/mL), tal como lo indica el repositorio celular ATCC. Finalmente, el medio de cultivo RPMI 1640 completo se almacena y mantiene en la heladera a 4°C.

Descomplementación del Suero Fetal Bovino (SFB)

Para inactivar los factores del complemento presentes en el suero fetal, se descongela una botella de suero a 37°C, luego se aumenta la temperatura del baño de agua hasta 56°C; una vez alcanzada esta temperatura, se incuba durante 30 min. A continuación, se enfría la botella en baño de hielo y se alícuota convenientemente para almacenar en freezer a -20°C.

Descongelado de crioviales

Para almacenar células por largos períodos de tiempo, se utilizan crioviales de 1.4 mL con medio RPMI 1640 completo con un extra de 10% de SFB, suplementado con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y un millón de células en fase exponencial de crecimiento. Para descongelar células almacenadas a -80°C o en nitrógeno líquido, se coloca el criovial en baño de agua a 37°C. Una vez descongelados los crioviales, el contenido es inmediatamente trasvasado a tubos estériles de 15 mL, a los que se añade 5 mL de medio RPMI 1640 completo con un extra de 10% de SFB, precalentado a 37°C. Se centrifuga a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Luego, se aspira el sobrenadante utilizando una bomba de vacío, cuidando de no arrastrar el pellet celular. A continuación, se resuspende el pellet en 5 mL de medio RPMI 1640 completo con un 10% extra de SFB y se trasvasa a frascos de cultivo celular estériles de 25 cm², con la superficie tratada para adhesión. Finalmente, se colocan los frascos horizontalmente en una incubadora a 37°C, a 1 atmósfera de presión, con una concentración de CO₂ del 5% y 95% de humedad.

Mantenimiento del cultivo

Se debe observar y evaluar al microscopio el crecimiento y apariencia de las células en cultivo. Se realizan cambios del medio cultivo en función de la densidad celular del cultivo y del color del medio que contiene un indicador colorimétrico de pH. El medio

RPMI 1640 completo pasa del color rosado-rojo (rojo fenol pH 7.4), a un tono naranja amarillento pH alrededor de 6.5.

Subcultivo o Repique de la monocapa de células

Una vez alcanzado un 80-90% de confluencia en la monocapa celular, se realizan subcultivos para mantener el cultivo saludable en crecimiento. En primera instancia, se observa al microscopio óptico el correcto crecimiento y apariencia de las células en la botella de cultivo, que para estas consiste en la formación de una monocapa continua y uniforme. Con una pipeta de 2 mL y bomba de vacío, se descarta el medio de cultivo de la botella. Seguidamente, se realizan 2 lavados con PBS 1X y se adiciona una solución de tripsina 0.25% en cantidad suficiente para cubrir la monocapa celular. En un lapso de entre 3 y 6 minutos, se aprecian los signos de desprendimiento celular de la monocapa por observación al microscopio; inmediatamente, se agregan 5mL de medio RPMI 1640 completo para inactivar a la tripsina. Posteriormente, se pipetea enérgicamente para deshacer los acúmulos celulares no deseados, se transfiere todo el contenido a un tubo estéril de 15mL y se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos. A continuación, se descarta sobrenadante con una pipeta estéril conectada a una bomba de vacío. Luego se resuspende el pellet celular con 5 mL de medio RPMI 1640 completo hasta obtener una suspensión celular homogénea. Se toma una alícuota de la suspensión celular homogénea que contenga el número de células deseado para subcultivar y se agrega el volumen de medio necesario para obtener una suspensión de 5 mL en el frasco de cultivo de 25 cm². Finalmente, se deja el frasco incubando en estufa a 37°C, a una atmósfera de presión y una concentración de CO₂ del 5% y 95% de humedad.

Recuento en cámara de Neubauer

Al observar al microscopio la cámara de Neubauer, se puede apreciar que esta presenta una cuadrícula conformada por nueve cuadrantes grandes, cada uno subdividido en otros dieciséis pequeños. El volumen sobre cada uno de aquellos nueve, es

aproximadamente de 0.1 μ L. Para realizar el recuento celular, se utilizan los dos cuadrantes grandes a cada lado de la cámara, de manera que se realizan cuatro determinaciones del número de células en el cuadrante grande, cuya media será el número de células en 0.1 μ L de la suspensión de células. Para reducir el error del recuento se deben contar tantos cuadrados como sean necesarios para acumular un mínimo de cien células. Finalmente, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se calcula el número de células por mL presentes en la suspensión original.

Congelado de células en crioviales

El congelado permite almacenar células de un cultivo por tiempos prolongados. Éstas se almacenan cuando el cultivo alcanzó un 80-90% de confluencia en la monocapa celular. En primera instancia, se verifica mediante observación al microscopio óptico el crecimiento del cultivo y se procede al desprendimiento de células por tripsinación, tal como se explicó anteriormente para el subcultivo. Luego de contadas las células en la cámara de Neubauer, se toma una alícuota de la suspensión celular que contenga entre 1 a 2×10^6 células/vial. Se adiciona medio de congelación de modo que cada vial resulte en un volumen final de aproximadamente 1.4 mL de medio RPMI 1640 completo, suplementado con 5% de DMSO como agente crioprotector y 10% de SFB extra. Para ello se realiza una solución de congelado, que consta de medio RPMI 1640 completo suplementado con 10% DMSO y 30% SFB. Con esta solución, se realiza una dilución 1:1 con la suspensión celular, para que finalmente obtener el porcentaje deseado de 5% de DMSO y 20% SFB en la solución final. Seguidamente, se colocan los crioviales en un recipiente con alcohol isopropílico, que permite la disminución gradual y controlada de la temperatura ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) cuando se coloca en un freezer -80°C . Luego, se mantienen

los crioviales durante por lo menos un día en el freezer -80°C , para finalmente trasladarlos a cámara con nitrógeno líquido a -180°C .

Fraccionamiento bioguiado

Preparación de extractos

Los extractos se preparan de forma clásica. Luego de la colecta de las plantas las mismas se secan en estufa entre $50-60^{\circ}\text{C}$ durante doce horas aproximadamente. Luego se muelen hasta el grado de polvo, se pesan y se extraen, de preferencia se utilizan 150-250 g de planta molida con 600-800 mL de disolvente. Se realizan dos tipos de extractos, uno con metanol y otro con diclorometano. La extracción se realiza primero con metanol macerando el material vegetal por 12 horas, repitiendo el proceso cuatro veces. Luego se repite el proceso con diclorometano para obtener el extracto diclorometánico tres veces. Para finalizar la formación del extracto total metanólico y diclorometánico, cada disolución se evapora a vacío hasta sequedad y el crudo se almacena a temperatura ambiente en frascos herméticos para su posterior uso.

Los extractos metanólico y diclorometánico al igual que las fracciones de las cromatografías, son ensayados en las líneas celulares a una concentración de $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ y en base a su actividad en el ensayo de MTT serán sometidos a otros métodos de subfraccionamiento (fraccionamiento bioguiado).

Cromatografía en columna de sílica

El primer método de subfraccionamiento a utilizar es la cromatografía en columna de sílica. Esta etapa consta en la separación de familias moleculares utilizando

fraccionamiento por columna de sílica. Esta técnica logra separar las moléculas en base a su polaridad gracias a la interacción diferencial con la fase móvil y la fase inmóvil.

Para esto se hidrata la sílica con una fase móvil de polaridad conocida y se coloca en una columna de vidrio con un algodón en la punta para evitar que la sílica se filtre. Una vez que la sílica se asienta procedemos a colocar el extracto primario seco en la región superior de la columna (este previamente se adsorbió en sílica para obtener una muestra homogénea). Luego con la muestra sembrada en la columna se comienza el agregado de fase móvil y la elución, se controla el flujo con llave de paso. Se trabaja con un gradiente de menor a mayor polaridad de la fase móvil. Las subfracciones eluidas son colectadas en frascos separados y secadas por evaporación a vacío para su posterior almacenamiento y ensayo en la línea celular. El seguimiento de la elución se hace por Cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).

Cromatografía preparativa

La cromatografía preparativa constituye el segundo paso de subfraccionamiento al cual se someten las fracciones generadas por la columna de sílica. El mismo consta de sembrar la muestra mediante la ayuda de un tubo capilar a lo largo de una línea recta en una TLC. La placa de sílica se coloca en una cámara sellada con solvente de polaridad conocida (9:1 Hexano:Acetato de Etilo) que, por capilaridad subirá por la placa y generará la separación de las diversas moléculas en base a su afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria. Una vez que la primera banda de la cromatografía se encuentra próxima al final de la TLC, se quita de la cámara y se seca para luego raspar cada banda con una espátula de laboratorio. El polvo resultante del raspado se “lava” con un solvente orgánico (seleccionado en función de la solubilidad de la molécula) para separar las moléculas del extracto de la sílica. La solución resultante es secada por evaporación al vacío para su almacenamiento y ensayo en línea celular.

Ensayo de citotoxicidad en las líneas celulares

Para el ensayo de MTT de las líneas celulares tratadas con los extractos se preparan suspensiones homogéneas de 1×10^5 células/mL en medio RPMI 1640 completo, en fase de crecimiento exponencial. Se siembran 100 μ L de la misma por pocillo (1×10^4 células) en placas de cultivo de 96 pocillos, tratadas para adherencia celular. Se incuban a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Luego se agrega 100 μ L de medio completo y el extracto (en cualquiera de sus fases de fraccionamiento) a una concentración de 25 μ g/mL y se deja incubando durante 24 horas más. De igual manera se procede con los ensayos de molaridad conocida. Inmediatamente antes de colocar el MTT se observa cada pocillo al microscopio óptico 100X con el objetivo de evaluar la morfología celular y la formación de precipitados derivados del extracto. A continuación, se le añaden 20 μ L de MTT (5 mg/mL) en solución PBS 1X a cada pocillo. Se incuban 3 horas a 37 °C y 5% de CO₂ para permitir la formación de cristales de formazán. Luego se elimina el medio, mediante aspirado con pipeta estéril acoplada a una bomba de vacío. Seguidamente, se añade 100 μ L de DMSO, se cubre con papel aluminio y se homogeniza por agitación orbital moderada, durante 15 minutos. La lectura de densidad óptica (DO) se realiza en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode) a longitudes de onda de 570 nm y 690 nm. Posteriormente, se evalúa la relación de absorbancia a 570 nm-690 nm.

Caracterización molecular por RMN

La elucidación estructural de las moléculas se lleva a cabo mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN). Ésta permite estudiar núcleos atómicos, siendo los más utilizados ¹H y ¹³C, ya que son magnéticamente activos, es decir poseen un espín distinto de 0, lo que hace que resuenen a una frecuencia dada en presencia de un campo magnético. En primera instancia se realizan los experimentos de una dimensión ¹H RMN, ¹³C RMN y luego de dos dimensiones como

lo son *Correlation Spectroscopy (COSY)*, *Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC)* y *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC)*. Los espectros se realizan en un equipo BRUKER (400 MHz), empleando disolventes deuterados y tetrametilsilano como estándar interno. La información que se obtiene de cada una se describe a continuación.

1D RMN ^1H : contiene información acerca del desplazamiento químico (δ) y el acoplamiento escalar (J) de los núcleos. Además, el área de la señal se corresponde con el número de protones. 1D ^{13}C -RMN: ofrece caracterización relacionada directamente al esqueleto carbonado. No es posible emplear ^{12}C , debido a que carece de espín nuclear, por lo cual se utiliza ^{13}C , a pesar de su baja abundancia natural. Por lo general cada señal observada en el espectro corresponde a un único átomo de carbono, debido a la baja probabilidad de solapamiento. 2D ^1H - ^1H , COSY: identifica núcleos que comparten un acople escalar (J), la presencia de picos fuera de la diagonal en el espectro correlaciona directamente los protones acoplados. 2D ^1H - ^{13}C , HSQC: permite correlacionar los núcleos de ^1H y ^{13}C unidos directamente a través de un enlace. 2D ^1H - ^{13}C , HMBC: identifica acoples a larga distancia entre protones y carbonos, usualmente a 2 o 3 enlaces de por medio, ya que los enlaces directos este experimento no los registra. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm, las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las muestras se preparan en 600 μL de cloroformo deuterado (CDCl_3). Los espectros de RMN ^1H se registran operando a una frecuencia de RMN de protón de 400,13 MHz. Para los experimentos de correlación homo y heteronuclear COSY, HSQC y HMBC se utilizan las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo.

Test estadístico

Se utiliza el test de comparación múltiple de Dunnett que está basado en el test T de Student que compara las medias de cada condición con la media control. Para ello se utiliza el programa GraphPad Prism 6, en el cual también se realizan los gráficos.

Resultados

Evaluación de la citotoxicidad de las extracciones Iniciales metanólicas y diclorometánicas

Se comenzó con el análisis de actividad antineoplásica de los extractos metanólicos y/o diclorometánicos de cada planta (Tabla 1). El carácter anfifílico del metanol y diclorometano permite obtener una amplia diversidad de moléculas tanto de carácter hidrofílico como hidrofóbico de cada extracto. Dado que está reportado la interferencia de compuestos derivados de plantas en el ensayo de MTT (Bruggisser *et al.* 2002) que conducen a resultados artefactuales, se decidió evaluar los extractos en ausencia de células. Este experimento control identifica lo que de otra manera serían falsos negativos. Es decir, se evalúa si la reacción colorimétrica producto de la reducción del MTT es causada directamente por el extracto y no por la actividad enzimática celular (FIG 1 Anexo).

En las fracciones metanólicas y diclorometánicas iniciales (Tabla 1) se constató inhibición de la viabilidad celular mayor a 50% respecto al control DMSO en los extractos: T2, T3F1, T4, T6, T8, T19 y T20 (solo se incluyeron aquellas fracciones cuyo promedio y desvío estándar superan el 50% de inhibición de la actividad MTT). La única planta que presentó una disminución de la viabilidad de esta magnitud para todas sus fracciones fue *L. leucocephala*. También se observaron fracciones T13, T5 y T11 que superaron el valor 100% relativo al control (DMSO) FIG 7, lo que podría estar asociado a un aumento proliferativo y/o un aumento de la actividad metabólica del MTT producto del compuesto evaluado. El valor promedio y el desvío estándar de cada fracción se muestran en la Tabla Anexo 1.

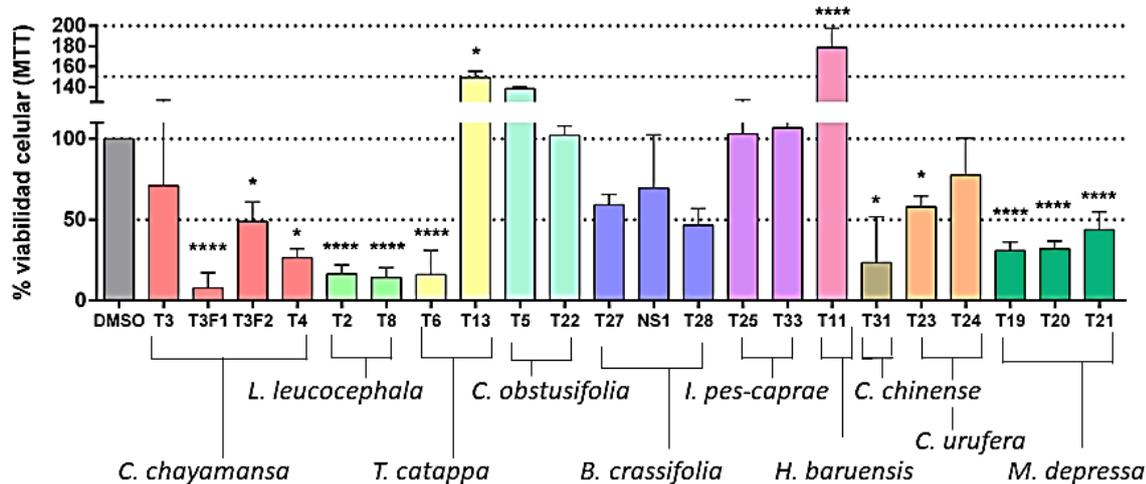


FIG 7 Ensayo de viabilidad celular (MTT) de los extractos metanólicos y diclorometánicos de las plantas evaluadas. En el gráfico se muestra el primer screening realizado utilizando los extractos metanólicos y diclorometánicos de las distintas plantas (detalles en Tabla 1). A la izquierda, se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO (DMSO). Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con su respectivo control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Fraccionamiento por Columna de Sílica de los extractos activos seleccionados

Para la siguiente etapa de fraccionamiento se eligieron algunas de las fracciones con la actividad buscada y se tuvo en cuenta su procedencia biológica, priorizando utilizar la mayor diversidad de plantas posible. Los extractos seleccionados para continuar el subfraccionamiento fueron: T2, T6 y T31 debido a su actividad con significancia estadística (FIG 7) y a T3 por su interesante actividad documentada en la introducción y fenotipo celular (morfológicamente similar a muerte apoptótica). Los valores de actividad MTT relativa al control fueron de 16.5%, 16.1%, 23.4% y 71.1 % respectivamente.

A partir del extracto T2, se obtuvieron 13 subfracciones de las cuales tres presentaron actividad: F28, F29 y F34, donde solo F29 presentó significancia estadística. Sus valores fueron semejantes entre si siendo $68.1 \pm 2.0\%$, $62.7 \pm 7.8\%$ y $64.0 \pm 14.0\%$ para T28, T29 y T34, respectivamente (FIG 8).

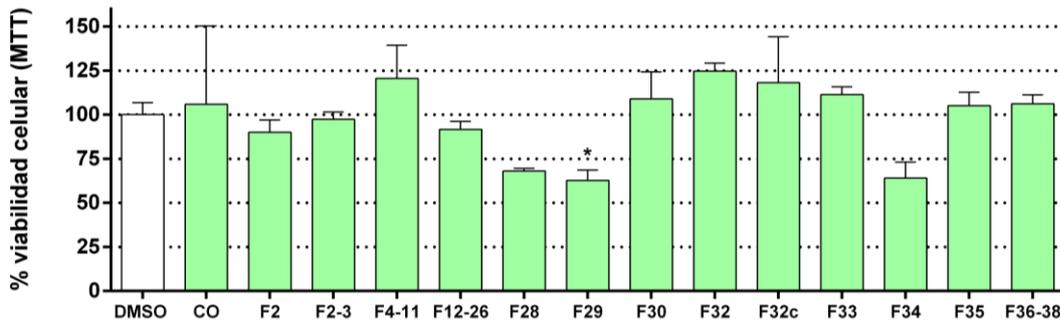


FIG 8 Subfraccionamiento por columna de sílica del extracto T2 de *Leucaena leucocephala*. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO (DMSO). Cada fracción corresponde a un tiempo de elusión distinto. CO: fracción derivada de extracción orgánica de la fracción inicial. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. * $p < 0.05$.

El extracto T3 que proviene de la planta *Cnidocolus chayamansa* resultó en un total de 10 subfracciones. Si bien esta fracción presentó una reducción de la viabilidad moderada comparada con las otras fracciones seleccionadas, fue fundamentalmente elegida en base al fenotipo presentado por las células al estar expuestas a esta fracción. La observación al microscopio óptico (100X) mostró un fenotipo del tipo apoptótico con características como pérdida de adhesión a la botella de cultivo, forma redondeada y presencia de deformaciones de la membrana celular. Las subfracciones F5-8 y F31

presentaron una actividad inhibitoria mayor, alcanzando los valores 51.94% y 40.66% respectivamente (FIG 9).

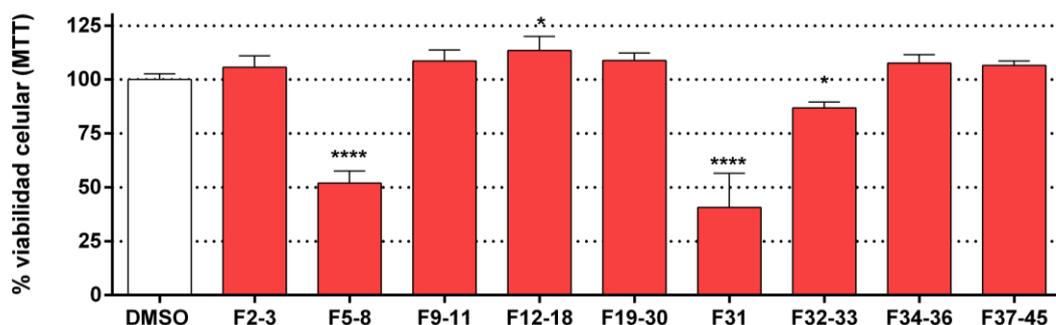


FIG 9 Subfraccionamiento por columna de sílica del extracto T3 de *Cnidocolus chayamansa*. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Cada fracción corresponde a un tiempo de elusión diferente. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

Las características apoptóticas observadas para la fracción T3 también se observó para la fracción F5-8 (FIG 10), consecuentemente siendo la fracción escogida para continuar con los métodos de fraccionamiento. La fracción F31 queda como perspectiva para continuar con los métodos de fraccionamiento y caracterización.

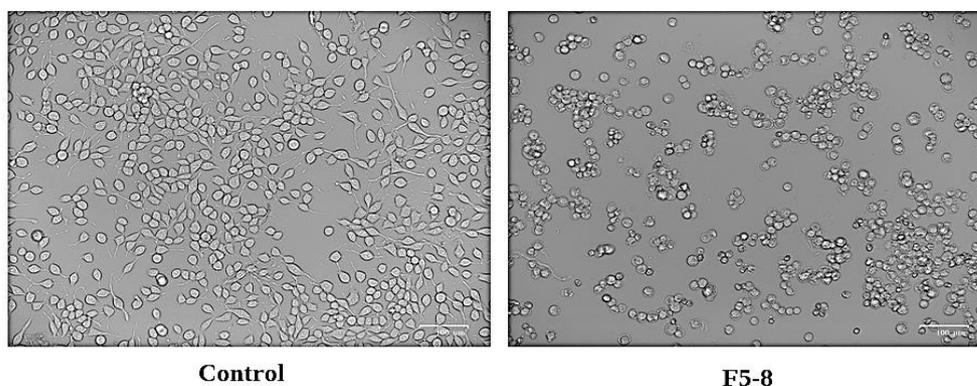


FIG 10 Observación al microscopio óptico de las células LNCaP frente a la exposición a la fracción F5-8 durante 24hrs. Se aprecian fotografías representativas de observación al microscopio óptico 20x de las células control y F5-8.

El extracto T6 corresponde a la planta *Terminalia catappa* y ninguna de las subfracciones mostraron cambios relevantes respecto al control en el ensayo de MTT. Cabe destacar que la fracción orgánica (CO) y el precipitado correspondiente a la fracción acuosa (CA pp) sí presentaron actividad (FIG 11).

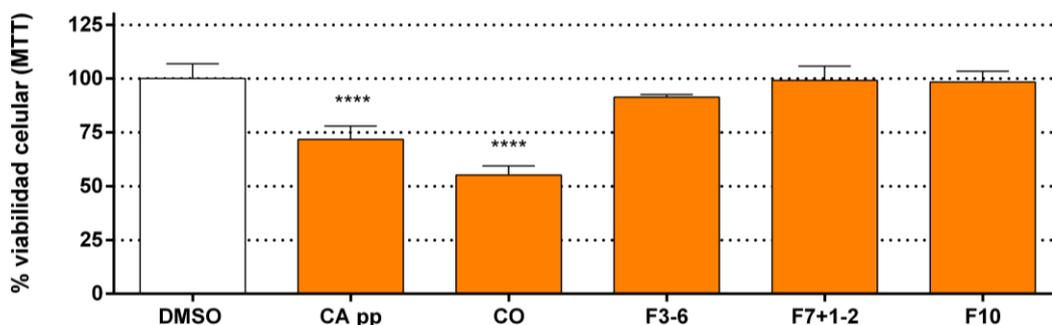


FIG 11 Subfraccionamiento por columna de sílica del extracto T6 de *Terminalia catappa*. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Cada fracción corresponde a un tiempo de elusión diferente. CO: fracción derivada de extracción orgánica de la fracción inicial. CA pp: precipitado derivado de fracción hidrosoluble de la fracción inicial. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de **** $p < 0.0001$.

El extracto T31 de la planta *C. chinense* presentó un total de siete subfracciones donde tres de ellas F0, F11 y F16 mostraron inhibición de la viabilidad (FIG 12).

Se eligieron las subfracciones F0 y F11 para continuar con las siguientes etapas de subfraccionamiento y elucidación estructural por tratarse de las subfracciones con mayor inhibición de la viabilidad celular $34.9 \pm 2.8\%$ y $54.5 \pm 1.0\%$, respectivamente.

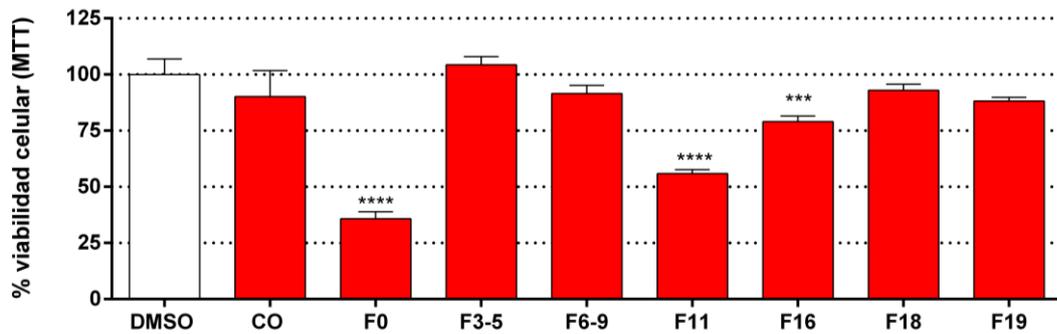


FIG 12 **Subfraccionamiento por columna de sílica de la fracción T31 de *Capsicum chinense***. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Cada fracción corresponde a un tiempo de elusión diferente. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En la FIG 13 se muestran imágenes representativas de las células tratadas con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de F0 durante 24 horas.

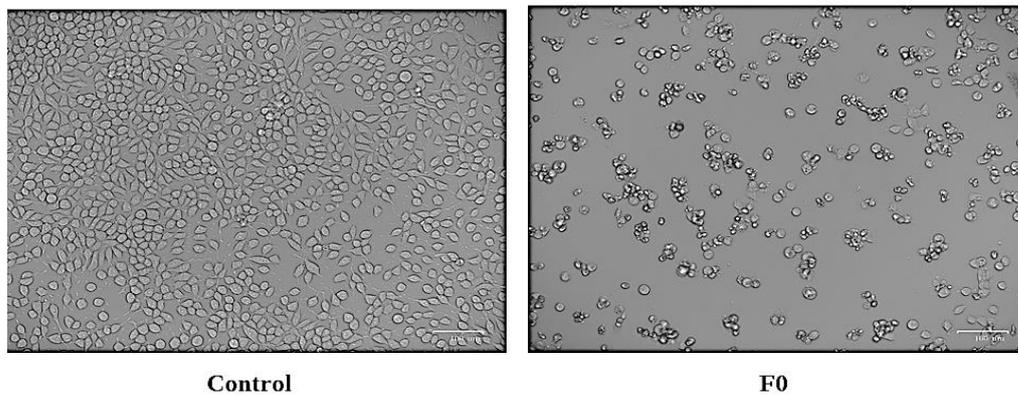


FIG 13 **Observación al microscopio óptico de las células LNCaP frente a la exposición a la fracción F0 durante 24hrs**. Se aprecian fotografías representativas de observación al microscopio óptico 20x de las células control y F0.

Subfraccionamiento por cromatografía preparativa de las fracciones seleccionadas provenientes de las cromatografías por columna de sílica.

Con los subextractos seleccionados luego de la separación por columnas de sílica se procedió a un segundo paso de fraccionamiento por cromatografía de capa fina (TLC). Puntualmente, se separaron por este método las subfracciones F29, F5-8 y F0 + F11 provenientes de la columna de sílica de los extractos T2, T3 y T31 respectivamente. La evaluación de las subfracciones generadas por la separación por TLC de la subfracción F29 de T2 mostraron nuevas subfracciones con actividad antineoplásica: Fp6, Fp8, Fp9 y Fp10 (FIG 14), siendo la última la que presentó el mayor porcentaje de inhibición de la actividad de MTT en LNCaP ($60.6 \pm 2.0\%$).

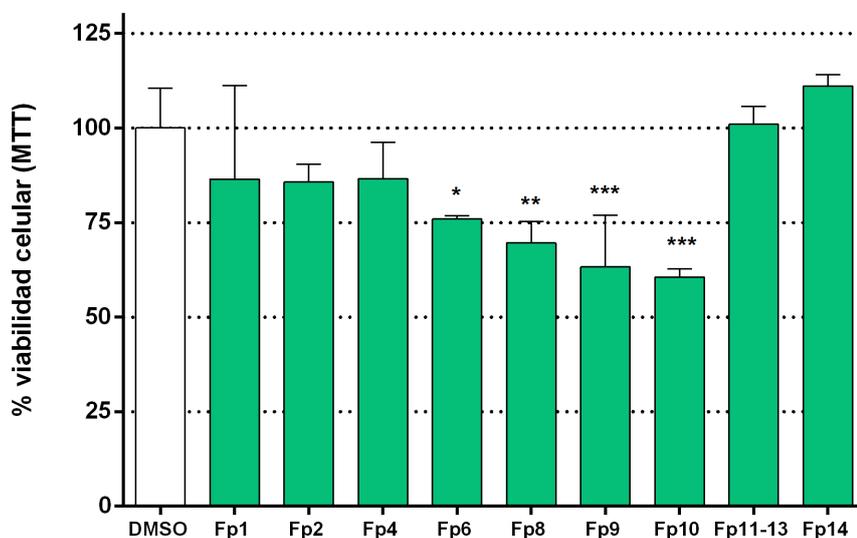


FIG 14 Subfraccionamiento por cromatografía preparativa de la fracción F29 del extracto T2 proveniente de *Leucaena leucocephala*. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Cada fracción corresponde a un RF (Ratio of Front) diferente. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

El subfraccionamiento por TLC de la fracción F5-8 proveniente del extracto T3 de *Cnidocolus chayamansa* (FIG 3Anexo) permitió separar 9 subfracciones. Únicamente la fracción Fp9 mostró inhibición de la viabilidad celular de 45.73% (FIG 15). Esta fracción fue sometida a espectroscopia de resonancia magnética nuclear para dilucidar la estructura de la molécula responsable. Los resultados se muestran más adelante en la sección “Caracterización estructural por RMN ^1H , COSY, HMBC y HSQC”.

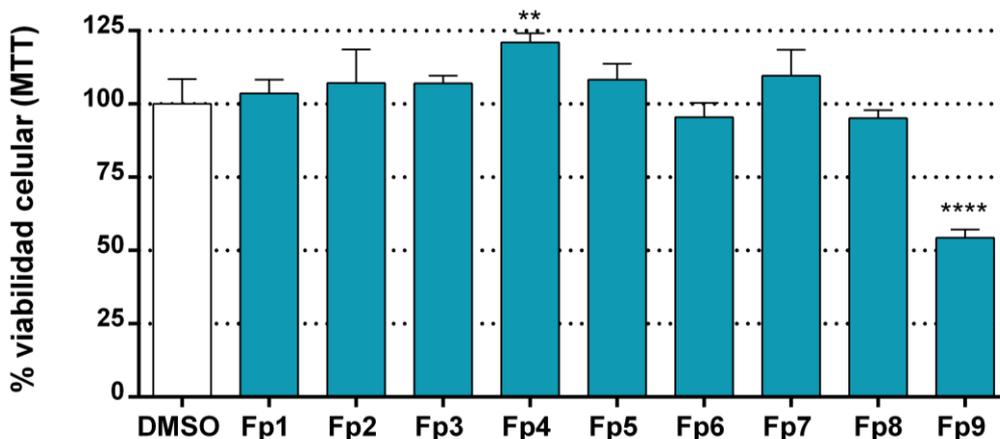


FIG 15 Subfraccionamiento por cromatografía preparativa de la fracción F5-8 del extracto T3 proveniente de *Cnidocolus chayamansa*. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Cada fracción corresponde a un RF (Ratio of Front) diferente. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Las subfracciones F0 y F11 del extracto T31 (*Capsicum chinense*) fueron sometidas a separación de cromatografía preparativa. En la FIG 3 ANEXO se muestra la TLC de F0 y en la FIG 16 los resultados del ensayo frente a la línea celular. Para F0 se aislaron cinco subfracciones distintas, donde la de mayor inhibición de la viabilidad celular fue Fp5 disminuyendo la misma a 76.4%.

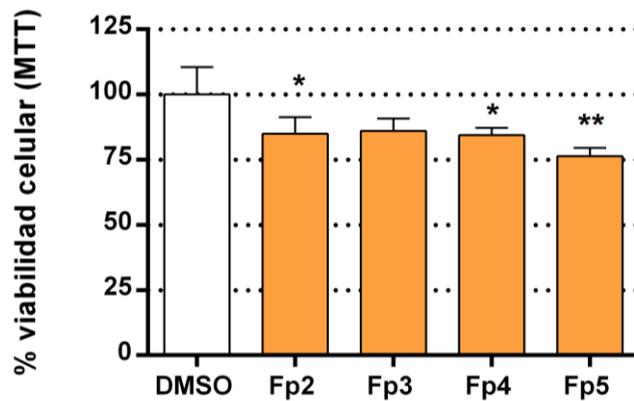


FIG 16 Subfraccionamiento por cromatografía preparativa de la fracción F0 del extracto T31 proveniente de *Capsicum chinense*. A la izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Cada fracción corresponde a un RF (Ratio of Front) diferente. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Por último, el nuevo subfraccionamiento de la fracción F11 de T31 no mostró subfracciones con inhibición significativa en la viabilidad celular en LNCaP. Sin embargo, se observan dos subfracciones Fp1 y Fp9ss que disminuyen la viabilidad celular a 85.0% y 82.6% respectivamente (FIG 17). Las fracciones Fp9 y Fp9ss surgen de una única fracción de elución que se separó en dos fases, una soluble y la otra insoluble (ss). Se seleccionaron las subfracciones de mayor actividad Fp5 de F0 y Fp9ss de F11 para realizar espectroscopia de RMN.

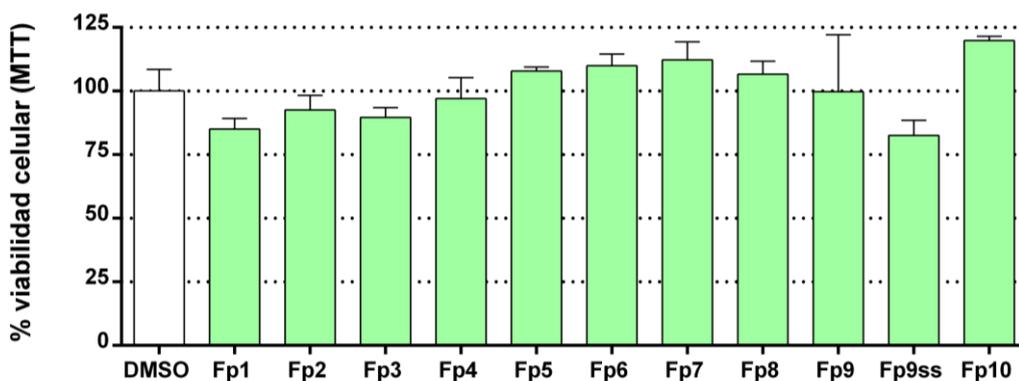


FIG 17 Subfraccionamiento por cromatografía preparativa de la fracción F11 del extracto T31 proveniente de *Capsicum chinense*. Cada fracción corresponde a un RF (Ratio of Front) diferente. A la

izquierda se encuentra el control con 0.3 % v/v de DMSO. Se realizó el test estadístico one-way ANOVA comparando cada columna con el control mediante el test de comparación múltiple de Dunnett con un valor alfa de 0.05. No se observó inhibición estadísticamente significativa.

Caracterización estructural por RMN ^1H , COSY, HMBC y HSQC.

Leucaena leucocephala (T2 F29 Fp10)

La primera fracción a la que se le realizó RMN para dilucidar su estructura fue T2 F29 Fp10. En este caso la cantidad de material que se obtuvo del último paso fue insuficiente y consecuencia de esto no se logró un espectro de protones informativo (FIG 18). Notar que el pico correspondiente al solvente es mucho mayor que el resto (0 ppm). Este resultado se repitió en los ensayos de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones donde no se logró una señal clara de los distintos átomos (FIG 3Anexo y 5Anexo).

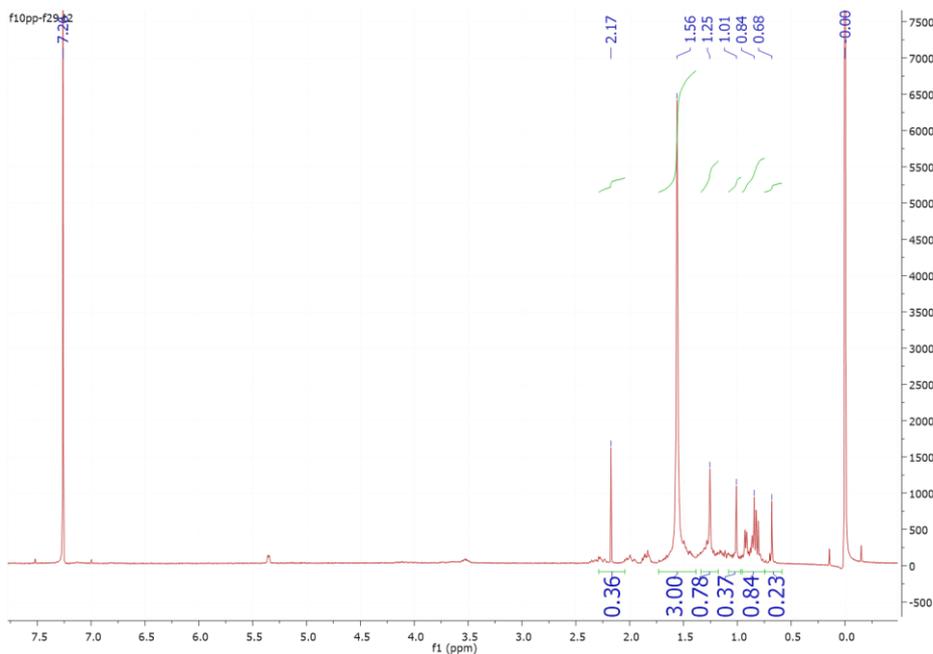


FIG 18 Espectroscopia por RMN de ^1H de la subfracción Fp10 proveniente de T2 F29.

Cnidoscolus chayamansa (T3 F5-8 Fp9)

La siguiente subfracción a la que se le realizó espectroscopia de resonancia magnética fue T3 F5-8 Fp9 de la planta *C. chayamansa*. En este caso, se obtuvo una única molécula mayoritaria correspondiente al éster metílico del ácido graso 8-metil nonanoico (FIG 19 y 20). En la Tabla 2 se resume la interpretación de las distintas técnicas espectroscópicas de una y dos dimensiones.

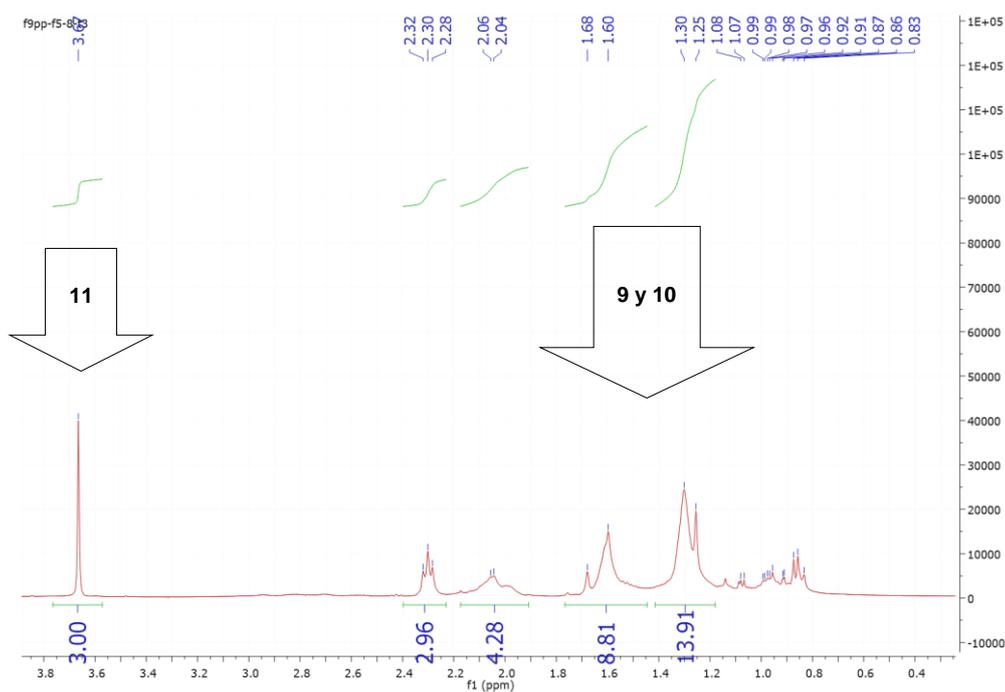


FIG 19 Espectroscopia por RMN ¹H de la subfracción Fp9 proveniente de T3 F5-8.

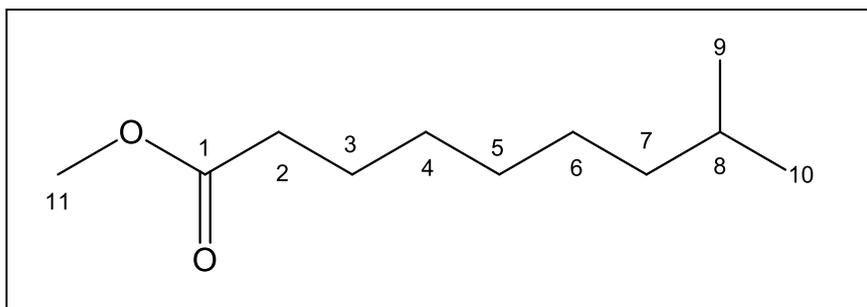


FIG 20 Estructura del éster metílico del ácido graso 8-metil nonanoico dilucidada a partir de los distintos espectros de RMN de una y dos dimensiones.

Tabla 2 Resultados de interpretación y asignación de picos del conjunto de técnicas de RMN.

H ¹ δ _H (ppm), integración	Multiplicidad	JH, H (Hz)	Nro	C ¹³ δ _C (ppm)
3.67, 3H	s	-	11	51
-	-	-	1	175
2.30, 2H	t	J= 2.32, J=2.30, J=2.28	2	34.1
2.30, 1H	s	-	8	28
2.02, 4H	m	-	7 y 5	29 y 39
1.3-1.6	m	-	3,4 y 6	25,29 y 27
1.65, 3H	d	J= 1.30, J=1.25	9	25
1.28, 3H	d	J= 1.30, J=1.25	10	25

Las diferencias en la integración de los hidrógenos en la zona alifática se deben a la presencia de impurezas derivadas de los disolventes utilizados en la manipulación. La estructura se confirmó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa.

Capsicum chinense (T31 F0 Fp5)

La tercer subfracción sometida a RMN fue T31 F0 Fp5 (FIG 21). De esta fracción se aisló el éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico (FIG 22). Dicha molécula sólo difiere de la aislada en la fracción correspondiente a *C. Chayamansa* en un doble enlace que está presente en esta nueva molécula en los carbonos 6 y 7, además de poseer el éster etílico en lugar del éster metílico.

En la Tabla 3 se resume la interpretación de los distintos abordajes basados en resonancia magnética nuclear. También se verificó la estructura utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

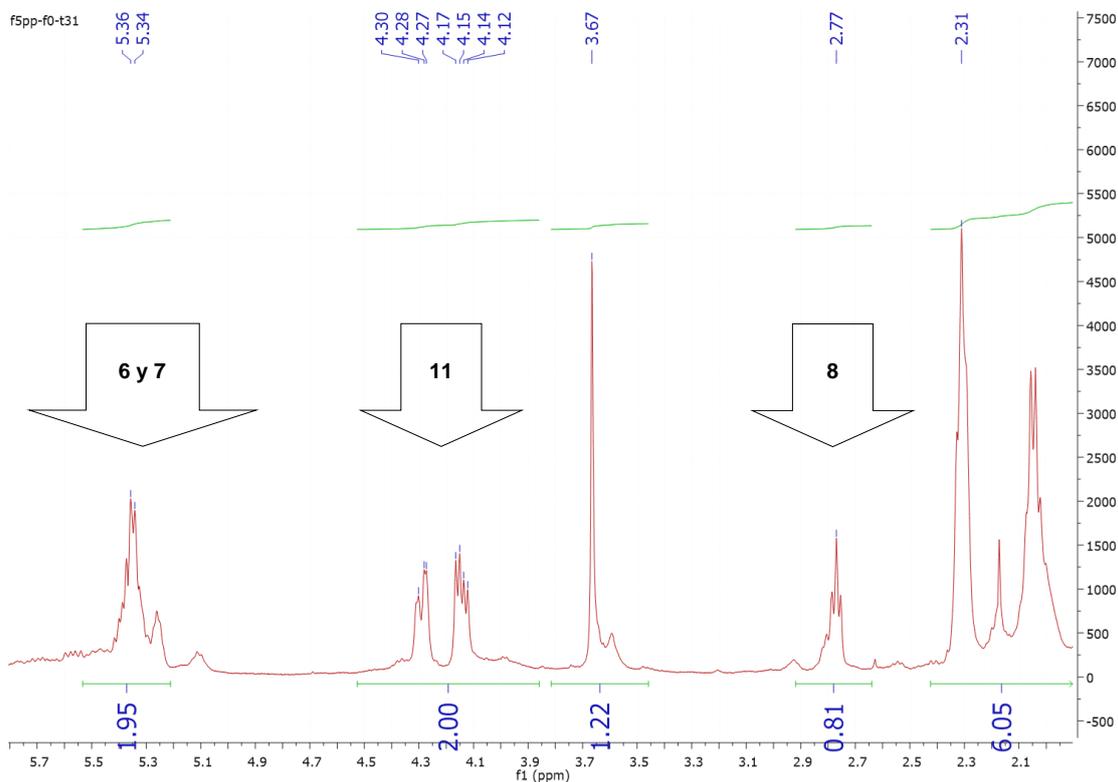


FIG 21 Espectroscopia por RMN ^1H de la subfracción Fp9 proveniente de T31 F0 Fp5.

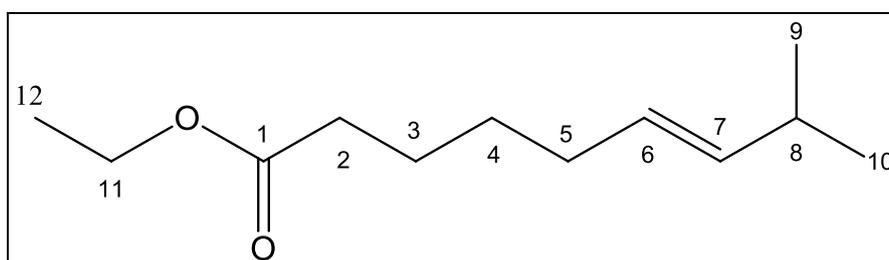


FIG 22 Estructura del éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico dilucidada a partir de los distintos espectros de RMN de una y dos dimensiones.

Tabla 3 Resultados de interpretación y asignación de picos del conjunto de técnicas de RMN.

H ¹ δ _H (ppm), integración	Multiplicidad	J _H , H (Hz)	Nro	C ¹³ δ _C (ppm)
-	-	-	1	175
2.30, 2H	m	-	2	34
5.35, 1H	m	-	6	128
5.35, 1H	m	-	7	130
4.28-4.15, 2H	m	-	11	62
2.27, 1H	m	-	3,4,5	32
2.31-2.10, 6H	m	-		25, 29, 32
2.31, 3H	s	-	9	22
2.05, 3H	s	-	10	22

Capsicum chinense (T31 F11 Fp9ss)

De la subfracción Fp9ss se obtuvo la estructura de la capsaicina y un compuesto minoritario contaminante denominado dihidrocapsaicina (FIG 23 y 24). La integración de los resultados de las distintas técnicas de RMN se resumen en la Tabla 4.

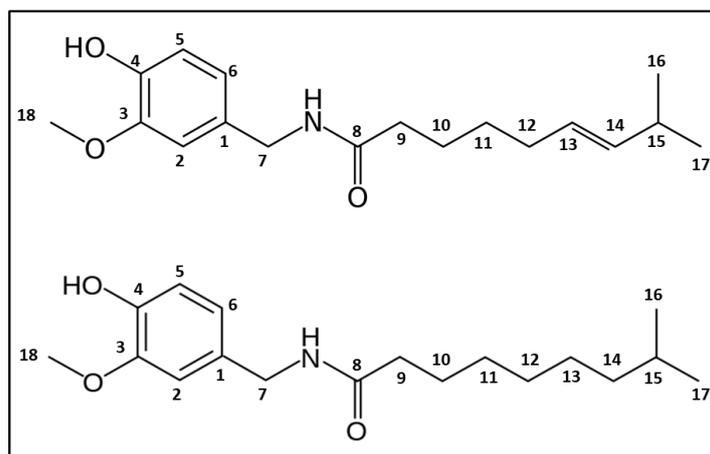


FIG 23 Estructura de la capsaicina (arriba) y dihidrocapsaicina (abajo) dilucidada a partir de los distintos espectros de RMN de una y dos dimensiones.

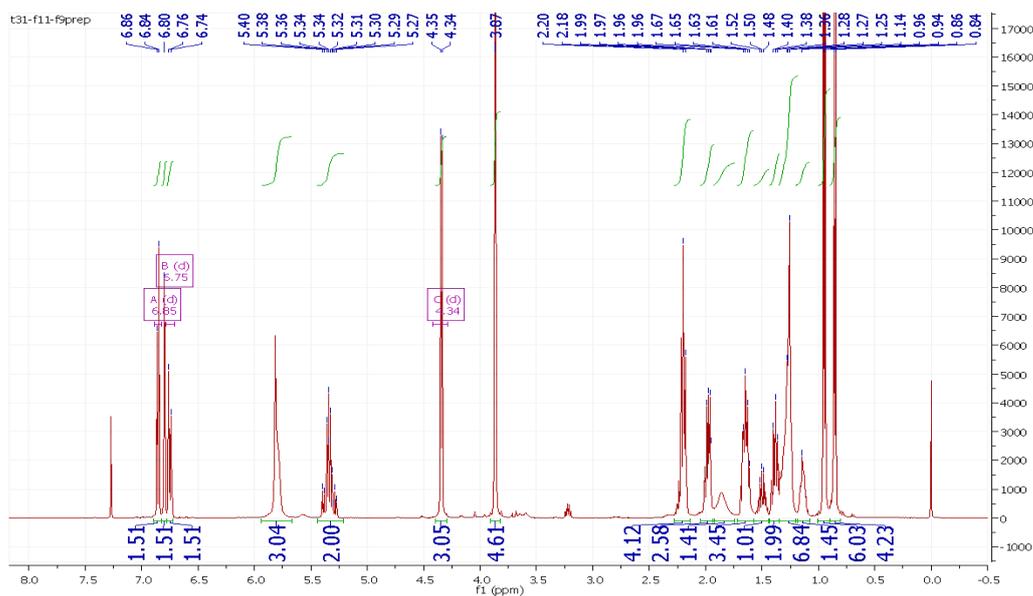


FIG 24 Espectroscopia por RMN de ^1H de la subfracción Fp9ss proveniente de T31 F11. Los detalles se muestran en la Tabla 2 junto con los datos obtenidos por RMN de 2 dimensiones (COSY y HMBC).

Tabla 4 Resultados de interpretación y asignación de picos del conjunto de técnicas de RMN.

^1H δ_{H} (ppm), integración	Multiplicidad	J_{H} , H (Hz)	Nro	^{13}C δ_{C} (ppm)
-	-	-	1	145.8
6.80, 1H	s	-	2	110.66
-	-	-	3	120.58
-	-	-	4	110.3
6.85, 1H	dd	$J=6.86, J=6.84$	5	114.36
6.75, 1H	dd	$J=6.76, J=6.74$	6	120.59
4.34, 2H	dd	$J=4.34, J=4.35$	7	43.45
-	-	-	8	172.9
2.19, 2H	t	$J=2.22, J=2.20, J=2.18$	9	25.31
1.65, 2H	m	-	10	25.67
1.38, 2H	m	-	11	29.01
1.97, 2H	m	-	12	32.71
5.33, 1H	m	-	13	126.64
5.33, 1H	m	-	14	138.66
2.19, 1H	t	$J=2.22, J=2.20, J=2.18$	15	22.66
0.95, 3H	dd	$J=0.96, J=0.94$	16	22.78

0.95, 3H	<i>dd</i>	$J=0.96, J=0.94$	17	22.78
3.87, 3H	<i>s</i>	-	18	55.46
5.81, 1H	<i>s</i>	-	-	-
5.81, 1H	<i>s</i>	-	-	-

Ensayo de selectividad en diferentes líneas celulares de próstata.

Una vez dilucidada la estructura de la molécula responsable de afectar la viabilidad celular en la línea celular LNCaP se procedió a realizar ensayos de actividad estructural y de selectividad utilizando otras líneas celulares de próstata. Se utilizaron otras dos moléculas que cuentan con los distintos grupos químicos presentes en la capsaicina con el objetivo de evaluar la contribución de la actividad encontrada a una región específica de la molécula. La capsaicina está compuesta por un anillo de vainillina unido mediante un enlace amida con una cadena de alquenos que termina en dos metilos. Es por esto que se ensayó la citotoxicidad de la vainillina y de la curcumina. Esta última es una molécula que contiene dos anillos de vainillina unidos por una cadena de carbonos con un motivo β -dicetona central (FIG 25).

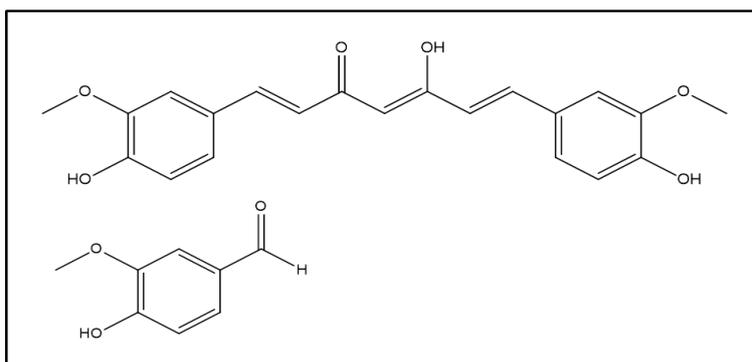


FIG 25 Estructura química de la curcumina (arriba) y vainillina (abajo).

Se realizaron ensayos de IC50 con ambas moléculas en cuatro líneas celulares cáncer de próstata. Tres de ellas son células metastásicas de CaPr, mientras que la restante (BPH-1), fue obtenida de una hiperplasia benigna de próstata y es utilizada como control de citotoxicidad inespecífica.

En el caso de la curcumina se constata citotoxicidad en las cuatro líneas celulares con IC50 representados en la Tabla 5.

Tabla 5 Resultados de la dosis respuesta de curcumina en las cuatro líneas celulares cáncer de próstata. Los cálculos de selectividad fueron realizados como el cociente de los valores de viabilidad celular de las distintas líneas celulares sobre el valor de la línea de referencia (BPH-1).

	BPH-1	DU145	PC3	LNCaP
IC50 (µM)	11.09	11.49	8.20	1.61
Selectividad	1	0.97	1.35	6.89

Por otro lado, las curvas de los gráficos se ajustan con valores de R² mayores a 0.9 mostrando un patrón típico de respuesta a dosis. Este patrón no se observa en el gráfico de la vainillina y los valores de R² son menores a 0.5 (FIG 26).

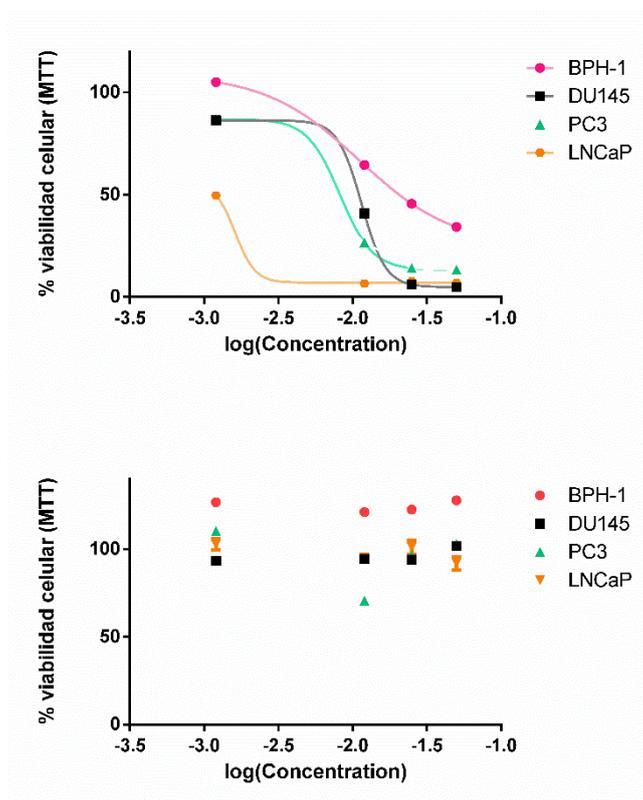


FIG 26 Gráficos de IC50 de Curcumina (arriba) y Vainillina (abajo). Las curvas fueron ajustadas con el programa GraphPrism 6. Los valores del coeficiente de determinación (R²) son mayores a 0.9 para curcumina y menores a 0.5 para vainillina. Los puntos que no están unidos por línea no pudieron ser ajustados al modelo de respuesta a dosis.

Como muestra la FIG 27 luego de elucidar la estructura del éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico también se realizaron ensayos de selectividad a dosis fija (133 μ M) en las cuatro líneas celulares de próstata. Como se puede apreciar en las FIGs 27 y 28 solo las líneas neoplásicas fueron afectadas. Los valores de inhibición de la viabilidad celular para las líneas LNCaP, DU145 y PC3 fueron de 40.91%, 75.95% y 61.68% respectivamente.

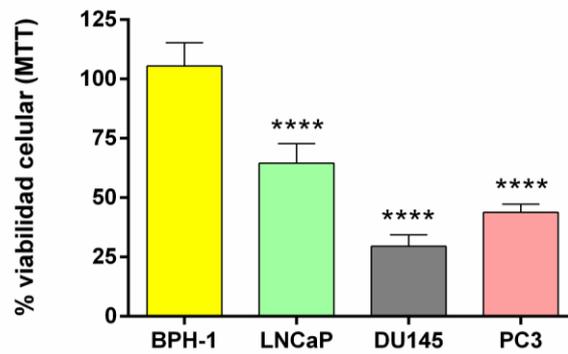


FIG 27 **Ensayo de selectividad del éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico en líneas celulares modelo de PrCa.** Cada columna corresponde a una línea celular distinta normalizada en función de su control 0.3 % v/v DMSO. Se utilizó el test estadístico one-way ANOVA por comparación múltiple de Dunnett realizado entre cada columna y su respectivo control DMSO. **** P-valor menor a 0.0001.

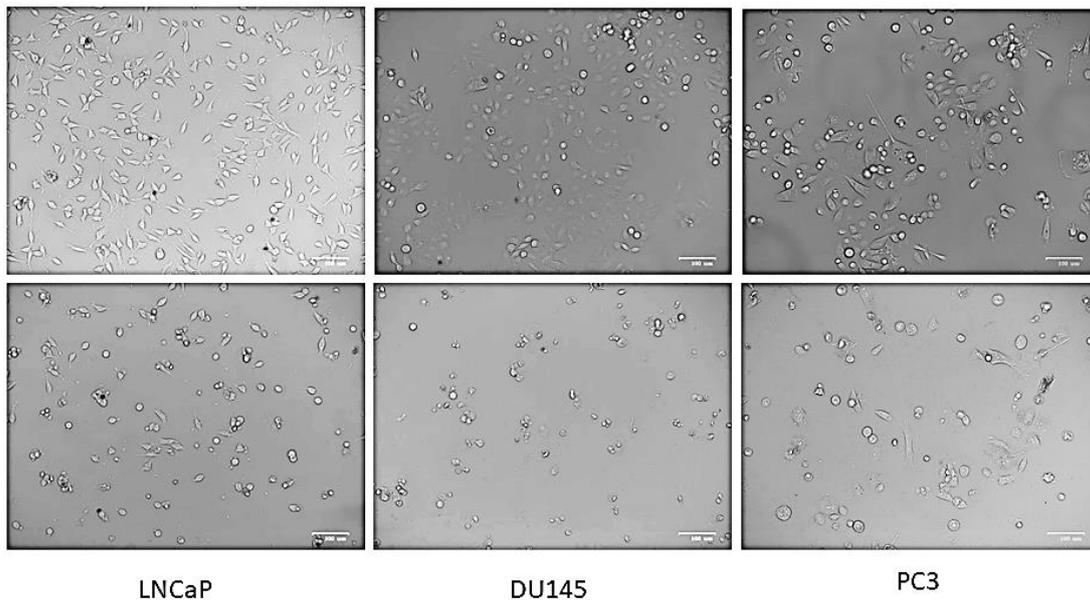


FIG 28 **Imágenes de microscopía óptica de las células tratadas con el éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico durante 48hrs.** En los cuadros superiores se encuentran los controles donde se siembran 0.3

% v/v DMSO en el medio. Abajo se encuentra las imágenes de las células postratamiento con el **ácido graso 8-metil 6-nonenoico** a dosis fija (133 μ M).

Discusión

Leucaena leucocephala (T2)

Cromatografía en columna de sílica

En el caso de T2 se obtuvo un valor de viabilidad celular de 16.5% mientras que la subfracción que evidenció más inhibición mostró un porcentaje de viabilidad de 62.7%. Dado que los ensayos fueron realizados a una concentración fija de 25 µg/mL independientemente del peso de las moléculas, se esperaría observar que las actividades fueran incrementando entendiéndose que se va enriqueciendo en la/s molécula/s activas. En relación a lo antes expuesto, pensamos que probablemente la actividad de la fracción T2 se deba que la actividad complementaria de varias moléculas que pueden estar presentes conjuntamente en T2 pero son separadas en las fracciones F28, F29 y F34 (FIG 8). Otra posible explicación es la disminución en la actividad debido a la aparición de precipitados que pueden afectar la viabilidad celular solo por alterar a las células físicamente. Dada la proximidad en la elusión de las fracciones activas F28 y F29 es lógico pensar que posean moléculas con propiedades fisicoquímicas similares. En el caso de F34 probablemente se trate de una molécula distinta de naturaleza más polar.

Cromatografía preparativa

En el caso de la fracción F29 proveniente de *Leucaena leucocephala* se obtuvieron mediante cromatografía preparativa, 14 subfracciones de las cuales 4 tuvieron actividad estadísticamente significativa. La subfracción más activa fue Fp10 que mostró valores similares a la fracción F29 de aproximadamente un 40% de disminución en la viabilidad celular. Como se observó en la FIG 1 ANEXO de las cuatro fracciones aisladas con actividad, las bandas de tres de ellas (Fp8, Fp9, Fp10) se encuentran muy próximas en la TLC lo que sugiere una naturaleza fisicoquímica similar. Por otro lado, Fp6 se encuentra separada del resto de las fracciones activas, por lo tanto, debe tratarse de una molécula

de naturaleza más apolar que las anteriormente mencionadas. En la bibliografía no se encuentran ensayos con extractos de *Leucaena leucocephala* en la línea celular LNCaP. Sin embargo, sí hay registro de ensayos en otras líneas celulares incluyendo a DU145 y la elucidación estructural de algunos de los compuestos responsables de la actividad (She *et al.* 2017). Estos pueden ser utilizados como referencia para futuras espectrometrías de RMN. Existen reportes sobre actividad anti metastásica del extracto etanólico de *L. leucocephala* como: inhibición de la expresión de MMP-2 y disminución de la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p38 implicadas en migración, pero sin elucidar la molécula responsable (Chung *et al.* 2017).

En resumen, esta planta exhibe un alto potencial en diversos aspectos vinculados al tratamiento del cáncer.

Cnidoscolus chayamansa (T3)

Cromatografía en columna de sílica

Las subfracciones de la fracción T3 mostraron una disminución de la viabilidad. De hecho, las subfracciones F5-8 y F31 presentaron una actividad inhibitoria mayor que su predecesora alcanzando los valores 51.94% y 40.66%, respectivamente (FIG 9). Estos resultados indican que hubo un enriquecimiento en la/s molécula/s activa/s. Al igual que

en la columna anterior tenemos dos fracciones con tiempos de elución distintos, por lo tanto, tenemos más de una molécula con actividad inhibitoria en la línea celular LNCaP.

Cromatografía preparativa

De las nueve fracciones aisladas en esta etapa, solo una tuvo el fenómeno buscado en la viabilidad de la línea celular. Esta fracción fue seleccionada para ser sometida a espectroscopia de resonancia magnética nuclear para dilucidar su estructura.

Caracterización estructural por RMN ^1H , COSY, HMBC y HSQC

En el caso de esta fracción contamos con un ensayo de espectrometría de masas el cual, utilizando bases de datos llegó a la conclusión de que la molécula era el ácido graso 8-metil nonanoico. Esta aproximación facilitó la interpretación de los espectros de RMN. En base a esta información se utilizó como referencia para la integración el espectro de protones del metil éster numerado como carbono 11 (FIG 20). Los hidrógenos del carbono 11 corresponden con el pico de 3.67 ppm. Mediante los espectros de HMBC y HSQC se puede observar que solo existe un carbono asociado a este pico de 51.49 ppm (FIG 10Anexo y 11Anexo). Este se encuentra en el rango en el que se suelen hallar los carbonos adyacentes a alcoholes y/o cetonas.

El siguiente carbono (C1) no tiene átomos de hidrógeno unido por lo que no veremos señal en el RMN ^1H . Sin embargo, se puede apreciar su señal de RMN C^{13} en la imagen de HSQC con un desplazamiento químico de 174.6 ppm, el cual, acopla su resonancia con los picos correspondientes a las demás secciones próximas de la molécula como son el carbono 11 (3.67 ppm), carbono 2 (2.3 ppm) y el carbono 3 y/o 4 (1.59 ppm). Este pico se encuentra dentro del rango de los carbonos sp^2 , que comprende la zona entre los 100-220 ppm, siendo consistente con los valores que toma el carbonilo.

A su vez, se puede correlacionar al pico de 1.59 ppm con el pico de 2.3 ppm por su acoplamiento de resonancia, mostrado en la imagen los resultados de COSY (FIG 9Anexo). El pico 2.3 ppm corresponde al alcano más próximo al carbono 1 que se encuentra desplazado hacia la izquierda, es decir, resuena a frecuencia mayor que los

demás alcanos. Esto se debe a que se encuentra desapantallado por los átomos de oxígeno y el doble enlace, creando un campo magnético neto a favor del campo magnético constante inducido por el resonador. Además, este pico integra aproximadamente 2 en su espectro de RMN ^1H y muestra una multiplicidad de 3 causada por sus 2 protones vecinos del carbono 3.

El pico correspondiente a 1.59 ppm integra 4 protones que corresponden a los carbonos 3 y 4. Estos se encuentran desapantallados en relación a los alcanos más lejanos a los oxígenos (5, 6 y 7), por lo tanto, en lugar de aparecer en el clásico pico de alcanos se observa desplazado hacia una frecuencia de resonancia mayor. Los siguientes 3 alcanos, sí se observan en el pico característico de 1.3 ppm. También se atribuye este pico al carbono 8 y a los metilos correspondientes a los carbonos 9 y 10 dado que la integración de protones es 13. Próximo al pico de 1.3 ppm, se encuentra otro (1.25 ppm) de menor área que integra aproximadamente 3. Este pico, es el que permite distinguir la multiplicidad doble de los metilos, dado que el otro en 1.3 ppm, se encuentra superpuesto con el de los alcanos. Esta multiplicidad es producto de su único protón vecino en el carbono 8.

La muestra analizada se encuentra contaminada con algunos productos minoritarios que pueden ser observados en todas las imágenes correspondientes a las técnicas de RMN presentadas en la sección resultados. Sus estructuras no han sido analizadas. Estos contaminantes fueron no significativos en el análisis con cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa.

Terminalia catappa (T6)

Cromatografía en columna de sílica

El subfraccionamiento bioguiado de *Terminalia catappa* por columna de sílica de la fracción T6 derivó en una pérdida de actividad (FIG 11). Al evidenciar este fenómeno, no se continuó investigando en esta fracción. Esto puede deberse a que se haya perdido la molécula activa durante el método de fraccionamiento, se haya modificado perdiendo

su actividad o el efecto observado es debido a una sinergia entre moléculas que indispensablemente precisen estar presentes en conjunto para generar el efecto inhibitorio. Una última posible causa que deriva de la técnica de extracción es la presencia de precipitados. Estos eventualmente pueden generar daño celular únicamente por un efecto físico, aunque no siempre se constata este efecto. Con los ensayos efectuados no nos fue posible discernir cuál fue la causa de dicha pérdida en estos casos. Cabe destacar que *Terminalia catappa* sigue siendo una planta interesante para profundizar en la investigación. Diversos trabajos sobre farmacognosia han demostrado su efecto en distintas patologías. Particularmente en cáncer, hay reportes *in vivo* e *in vitro* de inhibición de la traducción de proteínas implicadas en la degradación de la matriz extracelular como las metaloproteinasas MMP-2, MMP-9 y uroquinasa-PA (u-PA) muy importantes en la invasión y metástasis (Björklund et al. 2005). Sin embargo, no se ha profundizado en la elucidación estructural de la molécula responsable dado que utilizaron únicamente el extracto etanólico completo para realizar este ensayo (Yang et al. 2010, Chu et al. 2007).

Capsicum chinense (T31)

Cromatografía en columna de sílica

El extracto T31 de la planta *C. chinense* presentó un total de siete subfracciones donde tres de ellas F0, F11 y F16 mostraron inhibición de la viabilidad (FIG 12). En el caso de las fracciones F11 y F16, dado que eluyen en fracciones consecutivas podrían tratarse de la/s misma/s molécula/s. La/s molécula/s presentes en la fracción F0 probablemente

sean diferentes a la/s que se encuentran en las otras dos fracciones activas mencionadas anteriormente.

Cromatografía preparativa

Las subfracciones F0 y F11 fueron sometidas a separación de cromatografía preparativa. En la primera de ellas, se obtuvieron tres subfracciones con actividad relevante, dos de ellas Fp4 y Fp5 eluyeron consecutivamente, por lo que su actividad puede deberse a la/s misma/s molécula/s. En el caso de Fp2, lo más probable es que se trate de una molécula distinta.

En el segundo caso, no se obtuvo ninguna fracción con actividad estadísticamente significativa. Sin embargo, se puede observar una tendencia a la disminución de la viabilidad en dos casos. El primero, se puede observar si se comienza desde Fp1 hasta Fp4. Entre estas fracciones se ve una disminución que parece ser gradual, lo cual podría deberse a una contaminación con un patrón en gradiente de la molécula activa. En el segundo caso, Fp9ss si bien, no tuvo sustento estadístico, se ve una tendencia a la inhibición de la viabilidad.

Las subfracciones de mayor actividad Fp5 de F0 y Fp9ss de F11 fueron seleccionadas para realizar espectroscopia de RMN.

Caracterización estructural por RMN ^1H , COSY, HMBC y HSQC

Se escogió la fracción T31 F11 Fp9ss para realizar el espectro de RMN en base a su actividad, además, se tuvo en cuenta que en esta fracción podría encontrarse la capsaicina dado que el efecto era similar al IC50 (Ramos-Torres *et al.* 2016), al igual que su patrón de migración en la columna de sílica y en la cromatografía preparativa.

En este caso se utilizó como referencia la estructura de la capsaicina. La referencia para la integración de los picos del RMN ^1H fue el pico de 5.34 ppm. Éste corresponde con el pico característico de un doble enlace entre carbonos en una cadena de alcanos y, por lo tanto, se atribuye el valor de dos protones al área bajo el pico. Los carbonos

conectados por doble enlace son el 13 y 14 con desplazamiento químico de 126.64 ppm y 138.66 ppm respectivamente según HSQC.

Teniendo en cuenta dicha referencia se comenzó con el análisis utilizando los picos característicos de los átomos sustituyentes del anillo bencénico.

Cuando se aplica un campo magnético a los anillos bencénicos los electrones libres correspondientes a las nubes pi (π) generan una corriente eléctrica que a su vez generará un campo electromagnético a favor del campo inducido del lado externo del anillo, y contrario al campo inducido del lado interno. En estos casos el campo efectivo o campo neto que experimentan los átomos externos al anillo es mayor que si estuvieran en un ciclohexano y por lo tanto resuenan a menor frecuencia que estos últimos. Esto se traduce en el espectro de protones como un desplazamiento químico hacia menores frecuencias o más partes por millón.

Los hidrógenos del anillo suelen encontrarse entre 6 ppm y 8.5 ppm, en nuestro caso contamos con 3 protones unidos directamente a los carbonos 2, 5 y 6 del anillo y se encuentran en el espectro de protones como 6.80, 6.85 y 6.75 ppm, respectivamente. En el caso de los protones correspondientes a los carbonos 5 y 6 se puede ver una multiplicidad de 2. Esto se debe a que sus carbonos están unidos por un doble enlace que a su vez cuenta con dos sustituyentes distintos, lo que no permite la rotación del carbono. Al estar inmóviles no son equivalentes en términos de resonancia debido a que están sujetos a pequeñas diferencias en su entorno químico. El resultado es el denominado “efecto techo” o “geminal coupling” que genera para cada protón una señal de dos picos inducida por su protón vecino. Este fenómeno se ve en las señales de

los protones en cuestión. La imagen de COSY sustenta esta asignación de picos, dado que los protones se afectan en términos de resonancia entre ellos (FIG 4Anexo).

En el medio de los picos antes mencionados y con un único pico de valor de 6.80 ppm se encuentra el restante protón del anillo. Este átomo no tiene otra señal que la propia en COSY dado que no cuenta con protones cercanos (un enlace de distancia).

En base al espectro de medición de acoplamiento heteronuclear de un enlace o HSQC se atribuyen a cada pico de protones los carbonos de valores 110.66 ppm para el C2, 114.36 ppm para el C5 y 120.59 ppm para el C6 (FIG 5Anexo).

Mediante HMBC se atribuye la señal de valor 145.8 ppm al carbono 1, porque acopla su resonancia con el pico del C6, C2, el hidrógeno correspondiente al nitrógeno de la amida y el metilo del carbono 18 (FIG 6Anexo). El mismo procedimiento fue utilizado para atribuir un valor de desplazamiento a los carbonos 3 y 4. El C3 acopla con los protones de los picos 4.34 ppm y 6.80 ppm (C7 y C2) mientras que el C4 acopla con los picos correspondientes a los protones de los carbonos 5 y 6.

Por otro lado, si se observa el pico del doble enlace, podemos realizar una sucesión de acoplamiento en el espectro COSY que nos lleva a distinguir entre los alcanos de la cadena. El primero y más evidentes son los hidrógenos del carbono 12 con una fuerte señal. En menor medida también se puede observar una señal que proviene del pico 1.97 ppm en el cual se encuentra el hidrógeno del C15 junto con los del carbono 9 integrando un total de 3 protones.

El pico de 1.38 ppm corresponde con el carbono 11 de la capsaicina, dado que integra un total de dos protones, su multiplicidad o acoplamiento spin-spin se corresponde con los hidrógenos vecinos y además acopla su resonancia con las señales del carbono 12 y 10. Este último, se corresponde con el pico de 1.65 ppm que integra 2 y su multiplicidad es de cinco correspondiéndose con sus 4 protones vecinos que son equivalentes entre ellos. Esta señal se encuentra desplazada con respecto al resto de los alcanos, ya que se

encuentra más libre de electrones debido al oxígeno del carbonilo 8. Lo mismo sucede con la señal del carbono 9 que se encuentra en el pico de 1.97 ppm.

Con estos resultados y observando el espectro de HMBC se encuentra que el carbono 8 corresponde a la señal de 172.9 ppm. Este carbono se correlaciona con los picos correspondientes a los hidrógenos de los carbonos 7, 9 y 10. Además se encuentra dentro del rango de los carbonos sp^2 y dentro de este se encuentra en los valores estándar de los carbonilos correspondientes a ácidos, aldehídos y ésteres.

Los hidrógenos del pico 5.81 ppm tienen la forma clásica de los protones unidos a átomos muy electronegativos y es por esto que se le atribuyen al protón del nitrógeno (enlace amida) y al protón del alcohol sustituyente del anillo en el carbono 4.

Por último, los metilos correspondientes a los carbonos 16 y 17 se encuentran juntos en el doblete de 0.95 ppm que integra un total de 6 protones. Y el metilo del carbono 18 se encuentra desplazado hacia una mayor frecuencia debido a su átomo de oxígeno adyacente en el pico de 3.87 ppm.

En las distintas aproximaciones por RMN se puede constatar que existe una molécula contaminante similar a la capsaicina. Esta molécula genera integraciones de 1.5 veces el valor correcto. Esto se puede evaluar en los picos correspondientes al anillo, al carbono 18 y los oxígenos del alcohol y el nitrógeno.

La molécula en cuestión es llamada dihidrocapsaicina. Esta únicamente difiere en el doble enlace de la cadena de carbonos con respecto a la capsaicina. Esta forma saturada de la capsaicina genera que los átomos cercanos al mismo tengan un desplazamiento menor. Evidencia de esto se observa en el pico correspondiente a los átomos 16 y 17 que en lugar de estar en 0.95 ppm se encuentra en 0.85 ppm. Este pico, no integra el total de 6, sino que, integra aproximadamente la mitad, correspondiéndose con la

proporción de dihidrocapsaicina en la muestra. Lo mismo sucede con el pico de alcanos en 1.27 ppm.

El espectro de RMN de la fracción T31 F0 Fp5 presenta señales muy similares al espectro de RMN de T3 F5-8 Fp9 y T31 F11 Fp9ss.

Con respecto a la capsaicina, este espectro muestra gran parte de las señales menos las correspondientes al anillo de benceno y a los carbonos próximos a este. Y con respecto a T3 F5-8 Fp9 muestra gran similitud, aunque cuenta con la señal de un doble enlace (5.35 ppm) que produce un corrimiento hacia menores frecuencias de resonancia de algunos picos. Este pico fue utilizado como referencia para la integración asignándole un valor de 2 en el espectro de RMN ^1H .

En la señal de HSQC el pico del doble enlace solo se correlaciona con dos carbonos de valores 128.14 ppm y 129.84 ppm, valores similares a los del espectro de capsaicina.

Algunos de los picos que se encuentran en el espectro de protones, corresponden a contaminación. Estos dificultan la asociación de los metilos correspondientes a los carbonos 9 y 10 con el resto de la molécula. También dificultan la asignación de alcanos, dado que gran parte de la contaminación está presente en la zona entre 1.3 ppm y 1.26 ppm. Igualmente se observa claramente la señal del etilo de un éster que correlaciona con otros carbonos de la cadena principal del ácido graso base. También se puede apreciar la señal característica del hidrógeno unido al carbono terciario. Se puede especular que el ácido graso precursor de moléculas más complejas, que muestra actividad, se deriva en los ésteres identificados seguramente por modificación química posterior en los procesos de extracción y purificación.

Selectividad e IC50s

En el ensayo de IC50 de la molécula curcumina se obtuvieron valores similares a los antes reportados para algunas de las líneas celulares ensayadas (Lin *et al.* 2006), junto

con una distribución típicamente de respuesta a dosis con valores que se ajustaron al modelo con coeficientes de determinación (R^2) mayores a 0.9.

En cuanto a la selectividad frente a las distintas líneas celulares, la curcumina no presentó diferencia de inhibición entre las distintas líneas (FIG 26).

En el caso de la molécula vainillina la viabilidad celular no fue afectada en las dosis utilizadas, por lo tanto, los datos no se ajustaron al modelo de respuesta a dosis (FIG 26).

Para el éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico no se realizaron ensayo de IC50 por falta de material, pero se probó su citotoxicidad en las distintas líneas celulares a dosis fija (133 μ M) donde los resultados muestran inhibición diferencial entre las líneas celulares. Es relevante destacar que no se constató inhibición de la viabilidad para la línea celular benigna BPH-1, mientras que para las tres líneas celulares tumorales LNCaP, DU145 y PC3 sí se evidenció una inhibición de la viabilidad celular (FIG 27). Por lo tanto, la molécula ensayada muestra selectividad por las líneas celulares tumorales frente a la línea celular benigna a la concentración evaluada.

Los ensayos realizados con la molécula de vainillina demuestran que no sería este motivo por sí mismo el que genera el efecto evidenciado en las líneas celulares tumorales, sino que dependería de la sustitución en el carbono 1 (FIG 23) o al menos de parte de ella.

En el caso de la molécula de curcumina muestra actividad antineoplásica, aunque no selectivamente, cuando en el carbono 1 del anillo se coloca una cadena de carbonos insaturada. Estos resultados son reconocidos en Lin *et al.* 2006, donde además se muestra que cambios en las sustituciones del anillo de vainillina potencian la actividad de la molécula, fortaleciendo la idea de que la vainillina precisa de esta sustitución para ser activa y que el anillo también cumple un rol en esta actividad.

A pesar de lo antes expuesto, en nuestro trabajo se demuestra cómo la sustitución natural del carbono 1 de la capsaicina, el éster etílico derivado del ácido graso 8-metil 6-nonenoico afecta la viabilidad celular de manera selectiva e independiente del anillo de vainillina (FIG 27).

De los resultados de nuestro trabajo y la revisión bibliográfica podemos inferir que el farmacóforo de la capsaicina podría ser la región del anillo de vainillina junto con el enlace amida hasta el carbonilo.

Esta región podría ser la zona de la molécula que interacciona con el receptor potencial transitorio vainilloide tipo 1 (TRPV1), un canal de calcio no selectivo involucrado (entre otras funciones) en el ardor característico de los frutos del género *Capsicum* que se ha propuesto como uno de los mecanismos antineoplásicos de la capsaicina (Kobata *et al.* 2008, Ziglioli *et al.* 2009).

La conjetura antes expuesta se sustenta en que las moléculas identificadas que interaccionan con TRPV1 son: el capsaicinoide llamado “capsiate”, capsaicina y resiniferatoxina (RTX) (Kobata *et al.* 2008). Estas moléculas solo tienen un único motivo en común: el anillo de vainillina con el enlace amida en el carbono 1, con la posibilidad de que el enlace puede ser amida (capsaicina y RTX) o éster (capsiate).

Los niveles de ARNm y proteína de TRPV1 muestran una correlación positiva con el nivel de malignidad del tumor en muestras de CaPr proveniente de pacientes (Czifra *et al.* 2009). Esto convierte a TRPV1 en un posible indicador de malignidad y también un blanco para fármacos según Czifra *et al.* 2009.

En las líneas celulares LNCaP y PC3 este receptor se encuentra presente y activo, al igual que en muestras de tejido hiperplásico benigno de próstata (Kobata *et al.* 2008) por lo que pueden ser utilizadas para ensayos de actividad de TRPV1.

Conclusiones

En este trabajo se logró estandarizar el proceso de fraccionamiento bioguiado de extractos vegetales utilizando la línea celular LNCaP como modelo biológico del cáncer de próstata. Se validó este procedimiento mediante el aislamiento de la capsaicina a partir del extracto de *Capsicum chinense* dado que esta molécula presenta actividad antineoplásica reportada y se encuentra en todas las plantas del género *Capsicum*.

Se evaluó la actividad antineoplásica de un total de 10 plantas de la medicina tradicional Maya. Para las plantas *C. chayamansa*, *C. chinense*, *C. uvifera* *L. leucocephala*, *M. depressa* y *T. catappa* se constató un efecto en la viabilidad celular estadísticamente significativo para la línea celular LNCaP.

Se identificaron dos moléculas muy similares en estructura con actividad en la viabilidad celular de la línea celular LNCaP. Una de estas el ácido graso 8-metil 6-nonenoico precursora de la capsaicina (Aluru *et al.* 2003, Prasad *et al.* 2006), sin actividad antineoplásica reportada hasta el momento.

Este resultado se logró mediante dos caminos independientes, es decir, de dos extractos de plantas diferentes *Capsicum chinense* y *Cnidocolus chayamansa* fortaleciendo los resultados obtenidos. Dichas moléculas fueron identificadas como el éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico y el éster metílico del ácido graso 8-metil nonanoico (FIG 22 y 20).

Luego de dilucidadas estructuralmente, una de ellas (éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico) fue ensayada para evaluar la selectividad frente a las distintas líneas celulares. En este ensayo preliminar se constató selectividad hacia las líneas neoplásicas, frente a la línea celular benigna, lo que convierte a dicha molécula en un promisorio candidato para profundizar en sus mecanismos de acción y selectividad.

Finalmente, se contribuyó con la identificación del grupo farmacóforo de la capsaicina, proponiendo a la región de la vainillina y el enlace amida como el implicado en la interacción con TRPV1. Este antecedente sienta las bases para el posible diseño racional de moléculas agonistas de dicho receptor para el tratamiento del CaPr.

Perspectivas

Continuar con el fraccionamiento de todos los extractos activos en los que no se profundizó con las etapas de fraccionamiento posteriores. Identificar las moléculas implicadas en la actividad y profundizar en los mecanismos subyacentes. Utilizar ensayos de migración y/o invasión como método para evaluar el efecto de estas moléculas en dichos fenotipos críticos en la progresión del cáncer de próstata.

Realizar ensayos con el éster etílico del ácido graso 8-metil 6-nonenoico en más líneas celulares tanto neoplásicas como no neoplásicas con el objetivo de profundizar en la evaluación de la selectividad, al igual que determinar su IC50's.

IncurSIONAR en la síntesis de moléculas agonistas de TRPV1 utilizando las estructuras propuestas en este trabajo como compuesto líder.

Bibliografía

- Abeshouse, A., Ahn, J., Akbani, R., Ally, A., Amin, S., Andry, C. D., Zmuda, E. (2015). The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, 163(4), 1011–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025>
- Aluru, M. R., Mazourek, M., Landry, L. G., Curry, J., Jahn, M., & O'Connell, M. A. (2003). Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas, in Capsicum fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54(388), 1655–1664. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg176>
- Attard, G., Parker, C., A Eeles, R., Schröder, F., Tomlins, S. A., Tannock, I. S de Bono, J. (2015). Prostate cancer. *The Lancet*, 6736(14), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4)
- Björklund, M., & Koivunen, E. (2005). Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1755(1), 37–69.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.03.001>

- Bley, K., Boorman, G., Mohammad, B., McKenzie, D., & Babbar, S. (2012). A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicologic Pathology*, 40(6), 847–873. <https://doi.org/10.1177/0192623312444471>
- Bono, J. S. De, Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J., Kocak, I., Pompidou, E. G. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet*, 376(9747), 1147–1154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61389-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61389-X)
- Bruggisser, R., Von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(5), 445–448. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32073>
- Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Mihatsch, M. J. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Human Pathology*, 31(5), 578–583. <https://doi.org/10.1053/hp.2000.6698>
- Chu, S., Yang, S., Liu, S., Kuo, W., Chang, Y., & Hsieh, Y. (2007). In vitro and in vivo antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. leaves on lung cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1194–1201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.12.028>
- Chung, H.-H., Chen, M., Chang, Y.-C., Yang, S.-F., Lin, C.-C., & Lin, C.-W. (2017). Inhibitory effects of *Leucaena leucocephala* on the metastasis and invasion of human oral cancer cells. *Environmental Toxicology*, (November 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1002/tox.22399>
- Clark, R., & Lee, S. H. (2016). Anticancer properties of capsaicin against human cancer. *Anticancer Research*, 36(3), 837–844.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011>
- Czifra, G., Varga, A., Nyeste, K., Marincsák, R., Tóth, B. I., Kovács, I., Bíró, T. (2009). Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human

prostate carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(4), 507–514.
<https://doi.org/10.1007/s00432-008-0482-3>

- Fort, R., Trinidad Barnech, J., Dourron, J., Colazzo, M., Aguirre-Crespo, F., Duhagon, M., Álvarez, G. (2018). Isolation and Structural Characterization of Bioactive Molecules on Prostate Cancer from Mayan Traditional Medicinal Plants. *Pharmaceuticals*, 11(3), 78.
<https://doi.org/10.3390/ph11030078>
- García-Rodríguez, R. V., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A., Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz, M. Á., Cruz-Sánchez, J. S. (2014). *Cnidioscolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 937–943.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.004>
- Goldstein, A. S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I. P., & Witte, O. N. (2010). Identification of a Cell of Origin for Human Prostate Cancer. *Science*, 329(July), 568–571.
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(12), 931–47. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Gutierrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramirez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2(4), 341–7. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80079-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80079-1)
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

- Hayward, S. W., Dahiya, R., Cunha, G. R., Bartek, J., Deshpande, N., & Narayan, P. (1995). Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 31(1), 14–24. <https://doi.org/10.1007/BF02631333>
- Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Assavalapsakul, W. (2012). Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-217>
- Kobata, K., Tate, H., Iwasaki, Y., Tanaka, Y., Ohtsu, K., Yazawa, S., & Watanabe, T. (2008). Isolation of coniferyl esters from *Capsicum baccatum* L., and their enzymatic preparation and agonist activity for TRPV1. *Phytochemistry*, 69(5), 1179–1184. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.11.017>
- Kuti, J. O., & Konuru, H. B. (2004). Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidocolus spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 117–121. <https://doi.org/10.1021/jf030246y>
- Leon, J., Guerrero, I., & Pellicer, A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 7(4), 1535–1540. <https://doi.org/10.1128/MCB.7.4.1535>
- Lin, L., Shi, Q., Nyarko, A. K., Bastow, K. F., Wu, C. C., Su, C. Y., Lee, K. H. (2006). Antitumor agents. 250. Design and synthesis of new curcumin analogues as potential anti-prostate cancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(13), 3963–3972. <https://doi.org/10.1021/jm051043z>
- Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., & Reynoso, R. (2010). Antioxidant, Antimutagenic, and Antidiabetic Activities of Edible Leaves from *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh. *Journal of Food Science*, 75(2), 68–72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01505.x>
- Ma, L., Zhao, J., Li, T., He, Y., Wang, J., Xie, L., Li, S. (2014). Association between Tumor necrosis factor - alpha gene polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Diagnostic Pathology*, 9(74), 1–11.

- Manigauha, A., Kharya, M., & Ganesh, N. (2015). In vivo antitumor potential of *Ipomoea pes-caprae* on melanoma cancer. *Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 426. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.153099>
- Miyahira, A. K., Lang, J. M., Den, R. B., Garraway, I. P., Lotan, T. L., Ross, A. E., Sciences, M. (2016). Multidisciplinary Intervention of Early, Lethal Metastatic Prostate Cancer: Report From the 2015 Coffey-Holden Prostate Cancer Academy Meeting. *The Prostate*, 76(October 2015), 125–139. <https://doi.org/10.1002/pros.23107>
- Miyahira, A. K., Roychowdhury, S., Goswami, S., Ippolito, J. E., Priceman, S. J., Pritchard, C. C. Sciences, M. (2016). Beyond Seed and Soil: Understanding and Targeting Metastatic Prostate Cancer; Report From the 2016 Coffey – Holden Prostate Cancer Academy Meeting, (September). <https://doi.org/10.1002/pros.23260>
- Nguyen, D. X., & Massagué, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 341–352. <https://doi.org/10.1038/nrg2101>
- Nguyen, D. P., Li, J., & Tewari, A. K. (2014). Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU International*, 113(2013), 986–992. <https://doi.org/10.1111/bju.12452>
- Ost, P., Bossi, A., Decaestecker, K., De Meerleer, G., Giannarini, G., Karnes, R. J., Briganti, A. (2015). Metastasis-directed therapy of regional and distant recurrences after curative treatment of prostate cancer: A systematic review of the literature. *European Urology*, 67(5), 852–863. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.09.004>
- Gutiérrez, R. M. (2016). Anti-inflammatory effect of birsonimadiol from seeds of *Byrsonima crassifolia*. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 561–566. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0078-7>
- Pistollato F., Giampieri F., and Battino M. (2015). The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem. Toxicol.*, vol. 75, pp. 58–70.

- Prasad, B. C. N., Gururaj, H. B., Kumar, V., Giridhar, P., Parimalan, R., Sharma, A., & Ravishankar, G. A. (2006). Influence of 8-methyl-nonenoic acid on capsaicin biosynthesis in in-vivo and in-vitro cell cultures of *Capsicum* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1854–1859. <https://doi.org/10.1021/jf052085z>
- Ramos-Torres, Á., Bort, A., Morell, C., Rodríguez-Henche, N., & Díaz-Laviada, I. (2016). The pepper's natural ingredient capsaicin induces autophagy blockage in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 7(2), 1569–83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6415>
- Sánchez J. (2013). Registro Nacional de Cáncer. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer – Uruguay. Médicos Ecuador.
- She, L., Liu, C., Chen, C., Li, H., Li, W., & Chen, C. (2017). The anti-cancer and anti-metastasis effects of phytochemical constituents from *Leucaena leucocephala*. *Biomed Res*, 28(7), 2893–2897.
- Teiten, M. H., Gaascht, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2013). Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), 1239–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.007>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *A Cancer Journal for Clinicians*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Wang, X., Fang, G., & Pang, Y. (2018). Chinese Medicines in the Treatment of Prostate Cancer: From Formulas to Extracts and Compounds. *Nutrients*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/nu10030283>
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K. D., Walker, D., Yu, H., Halili, M. V., Shen, M. M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*, 461(7263), 495–500. <https://doi.org/10.1038/nature08361>

- Weingberg R.A. (2007). The Biology of Cancer. Garland Science.
- Yang, S., Chen, M., Hsieh, Y., Yang, J., Zavras, A., Hsieh, Y., Chu, S. (2010). Antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L . on oral cancer via a down-regulation of metastasis-associated proteases. Food and Chemical Toxicology, 48(4), 1052–1058. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.019>
- Zarin, M. A., Wan, H. Y., Isha, A., & Nurdin, A. (2016). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. Food Science and Human Wellness, 5(2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.02.001>
- Zheng, L., Chen, J., Ma, Z., Liu, W., Yang, F., Yang, Z., Li, L. (2015). Capsaicin causes inactivation and degradation of the androgen receptor by inducing the restoration of miR-449a in prostate cancer. Oncology Reports, 34(2), 1027–1034. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4055>
- Ziglioli, F., Frattini, A., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffreda, M., & Cortellini, P. (2009). Vanilloid-mediated apoptosis in prostate cancer cells through a TRPV-1 dependent and a TRPV-1-independent mechanism. Acta Biomedica de l'Ateneo Parmense, 80(1), 13–20.
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=capsaicin&cntry=&state=&city=&dist=> Visita 20 de enero del 2018.

Anexo

Tabla 1Anexo Valor de la media y el desvío estándar del grafico correspondiente a la FIG 7.

	Media (%)	Desvío estándar (%)
T3	71.07	45.8
T3F1	7.793	7.7
T3F2	48.93	9.8
T4	26.58	4.4
T2	16.53	4.5
T8	14.27	4.9
T6	16.08	12.2
T13	149.0	5.2
T5	138.2	1.5
T22	102.3	4.6
T27	59.26	5.2
T28	69.65	8.3
NS1	103.2	26.8
T25	106.8	19.8
T33	178.8	5.5
T11	23.45	15.3
T31	58.95	23.1
T16	26.07	6.9
T39	57.94	4.4
T23	77.68	5.4
T24	30.89	18.6
T19	32.11	4.3
T20	43.81	3.8
T21	71.07	9.0

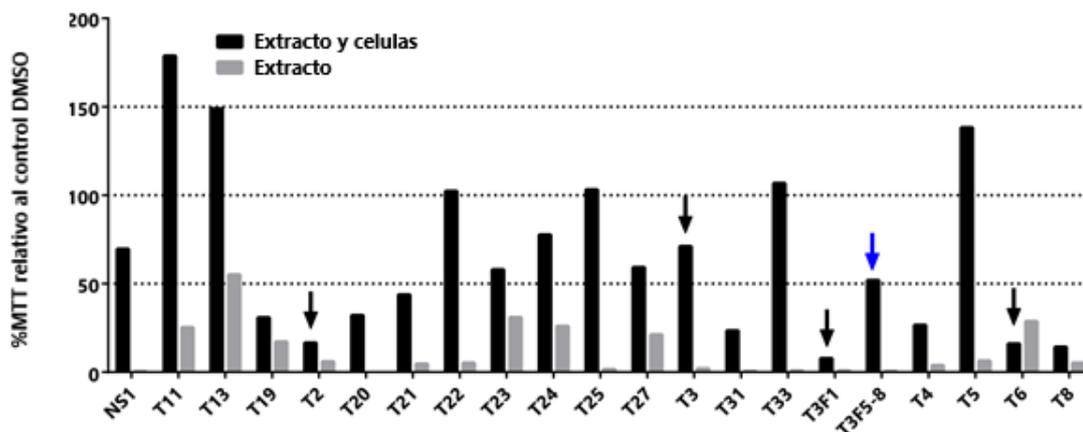


FIG 1Anexo Porcentaje de actividad de MTT (relativo al control DMSO) de los extractos en presencia (barras negras) y ausencia (barras grises) de la línea celular LNCaP. Las flechas negras indican los extractos seleccionados para los siguientes pasos. La flecha azul indica la fracción original donde se aisló el éster metílico del ácido graso 8-metil nonenoico.

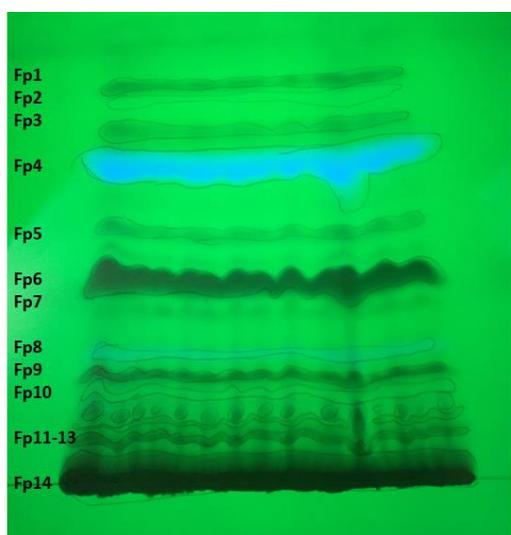


FIG 2Anexo **Cromatografía preparativa de la subfracción F29 derivada de columna de sílica de T2 revelada a 245 nm.** Las bandas son numeradas en orden creciente desde el frente de corrida hacia la línea de siembra. Se utilizó como fase móvil una solución 9:1 Hexano:Acetato de Etilo.

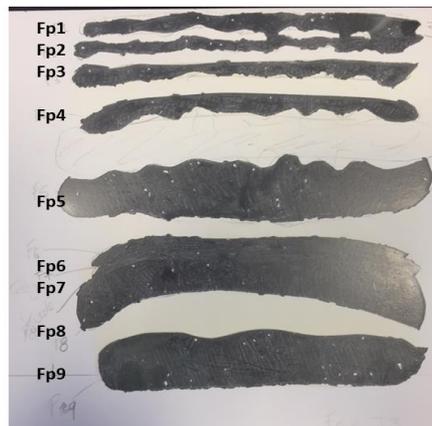


FIG 3Anexo Cromatografía preparativa de la subfracción F5-8 derivada de columna de sílica de T3 luego de extraídas las bandas. Las bandas son numeradas en orden creciente desde el frente de corrida hacia la línea de siembra. Se utilizó como fase móvil una solución 9:1 Hexano:Acetato de Etilo.

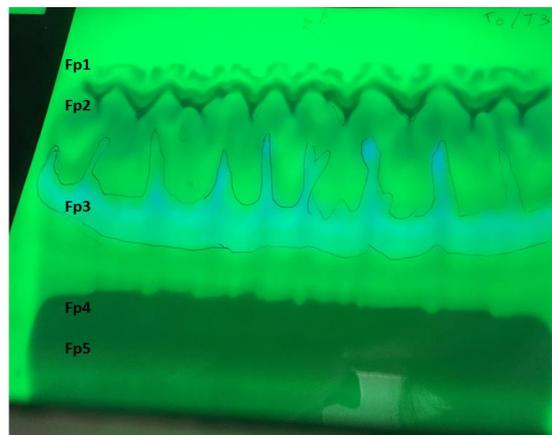


FIG 4Anexo Cromatografía preparativa de la subfracción F0 derivada de columna de sílica de T31 revelada a 245nm. Las bandas son numeradas en orden creciente desde el frente de corrida hacia la línea de siembra. Se utilizó como fase móvil una solución 9:1 Hexano:Acetato de Etilo.

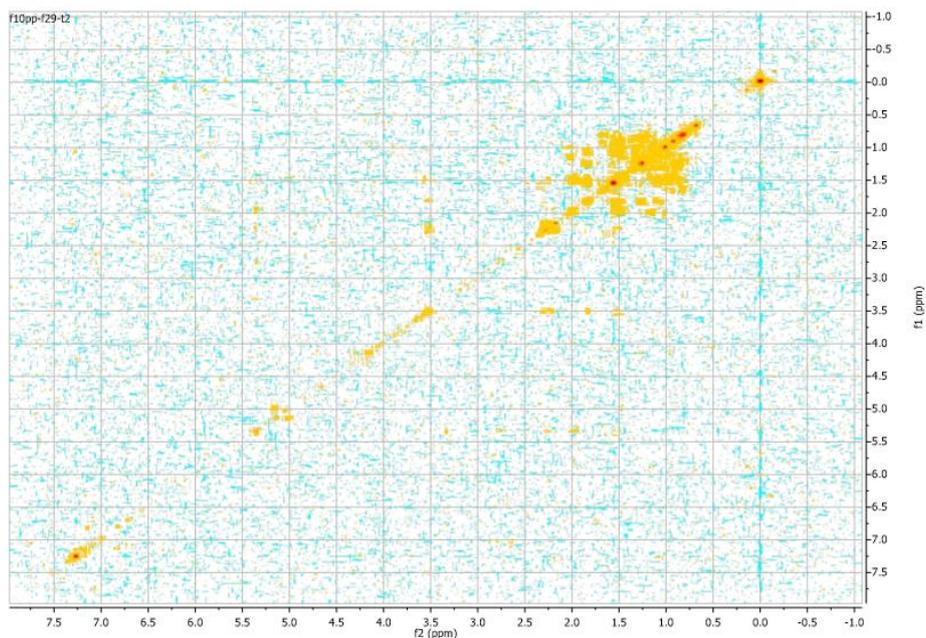


FIG 5Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones COSY de la subfracción Fp10 proveniente de T2 F29.

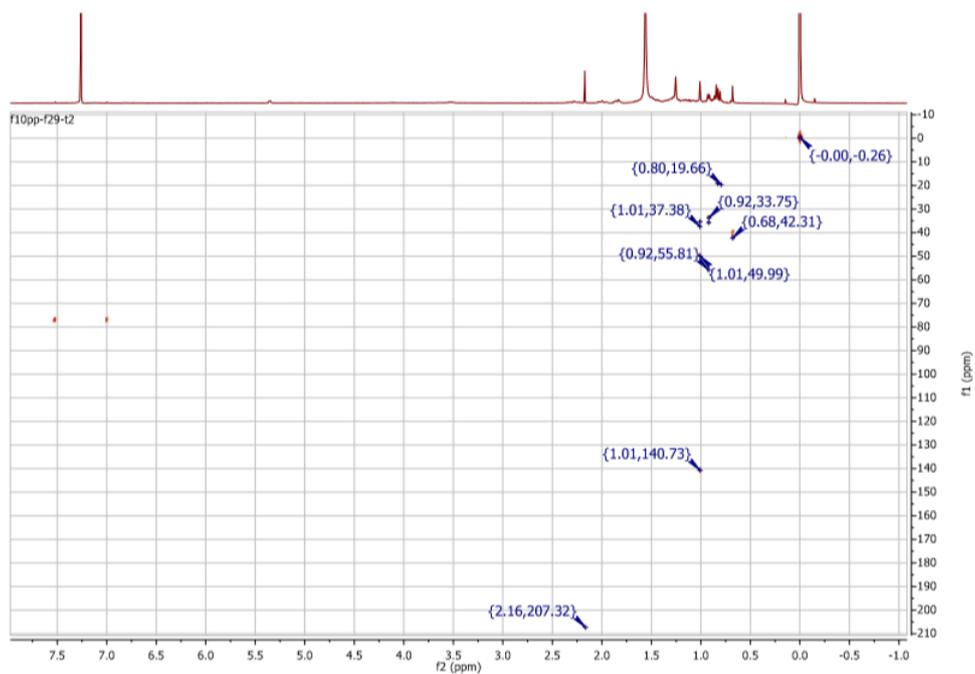


FIG 6Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones HMBC de la subfracción Fp10 proveniente de T2 F29.

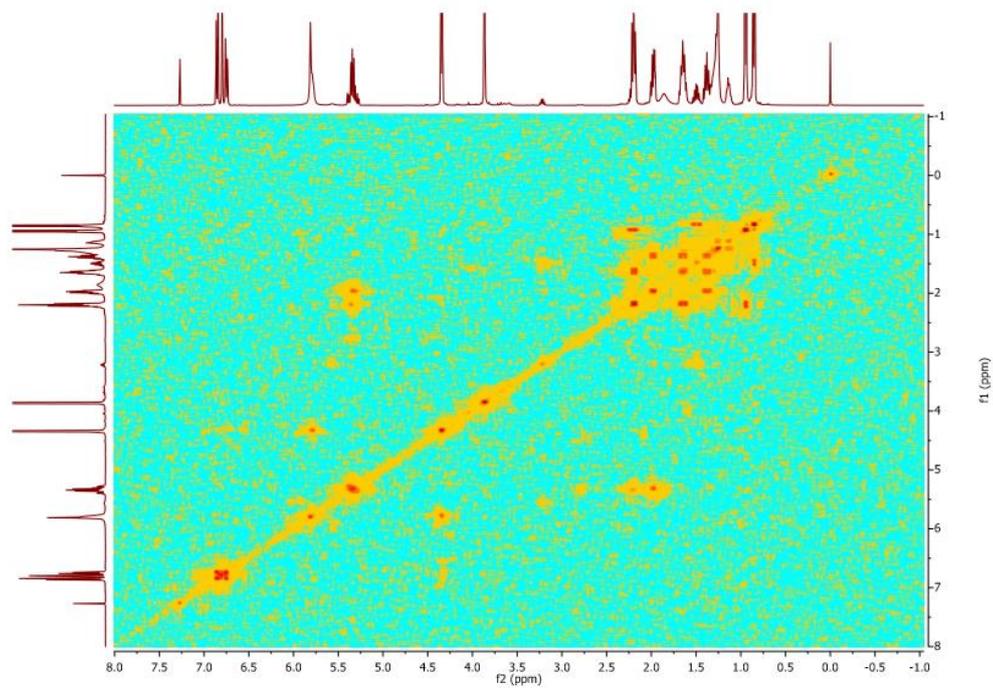


FIG 7Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones COSY de la subfracción Fp9 proveniente de T31 F11.

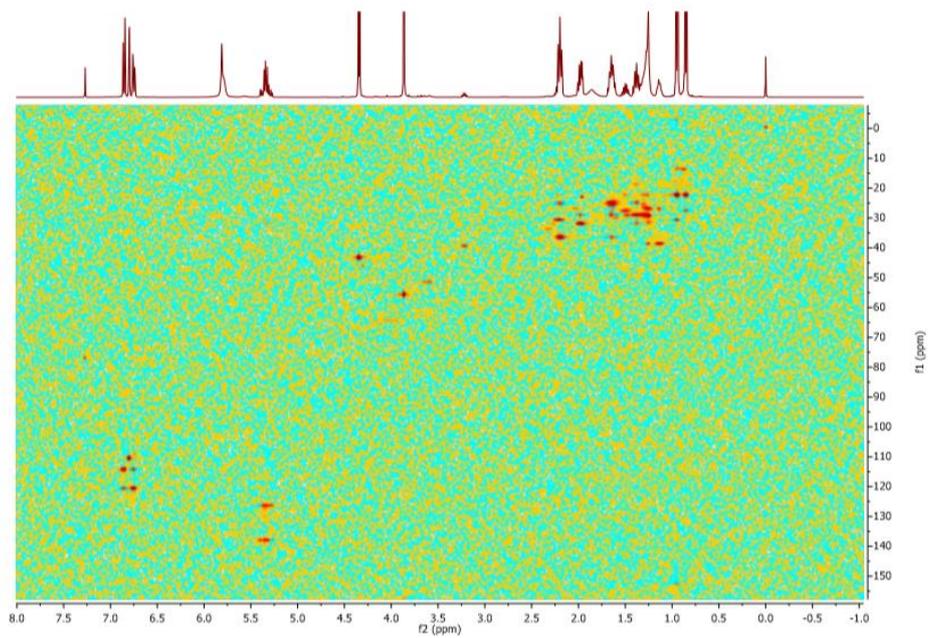


FIG 8Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones HSQC de la subfracción Fp9 proveniente de T31 F11.

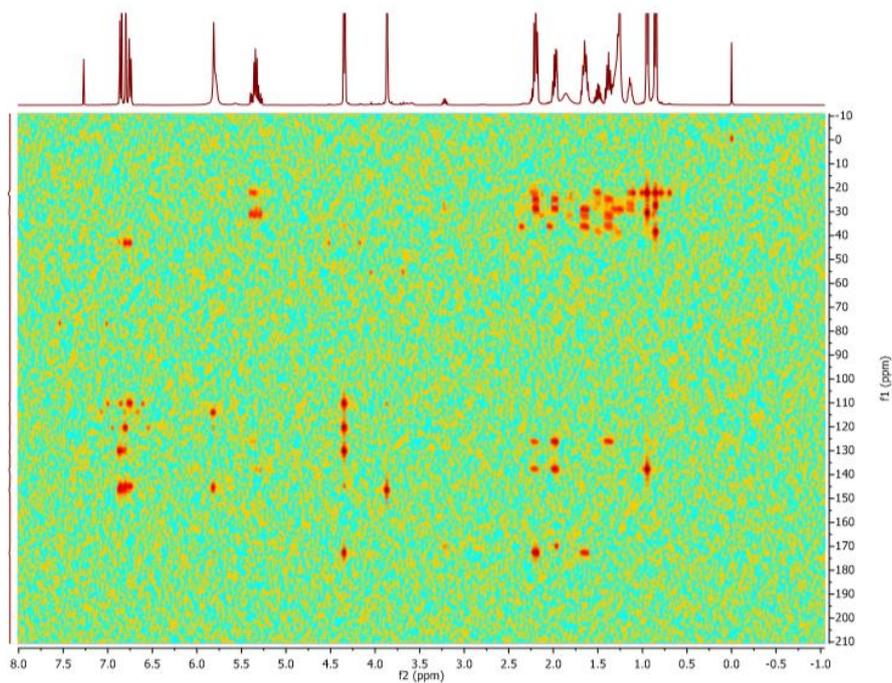


FIG 9 Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones HMBC de la subfracción Fp9 proveniente de T31 F11.

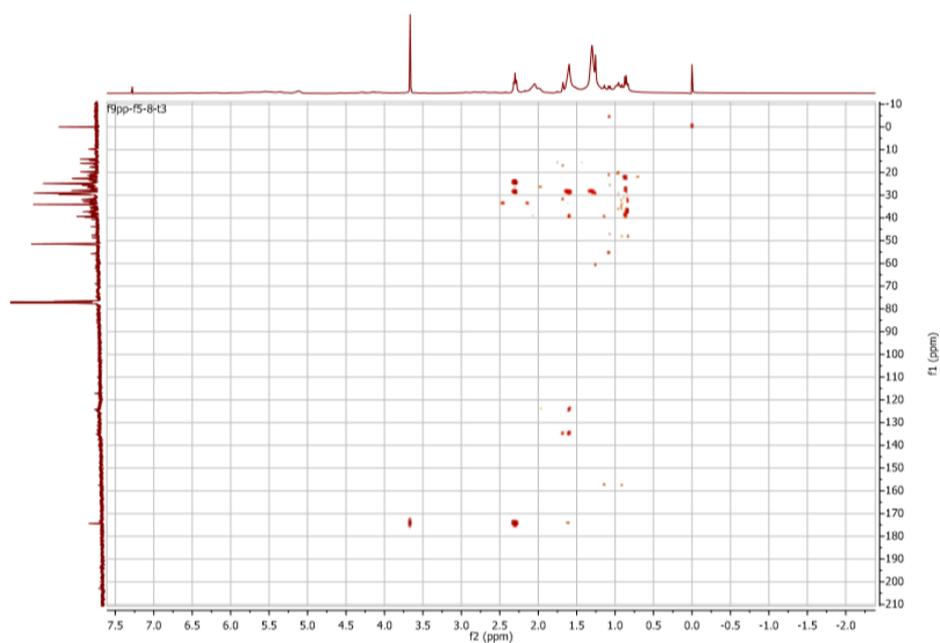


FIG 10 Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones HMBC de la subfracción Fp9 proveniente de T3 F5-8.

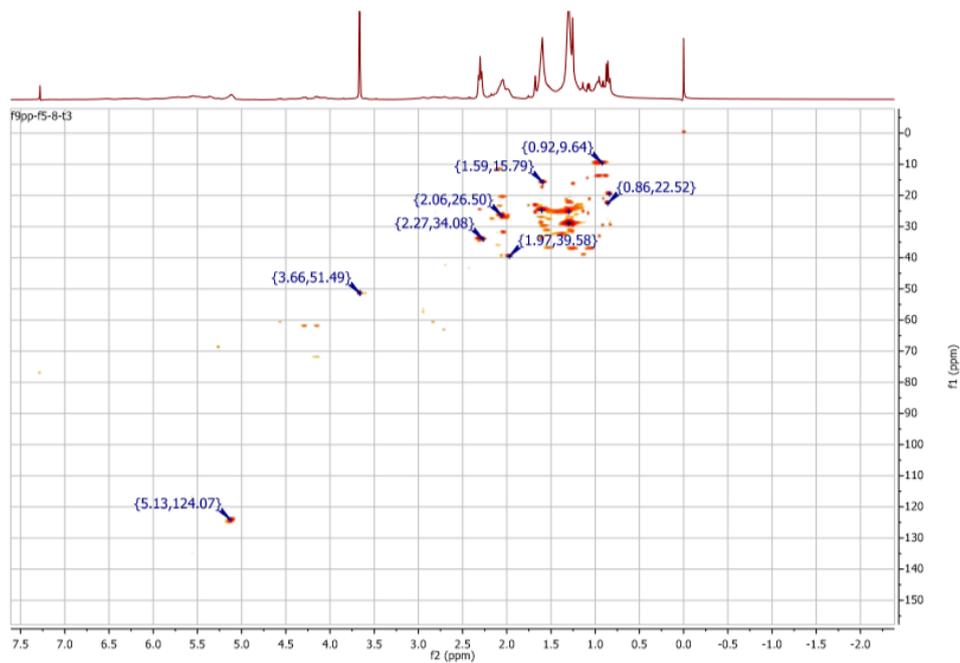


FIG 11 Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones HSQC de la subfracción Fp9 proveniente de T3 F5-8.

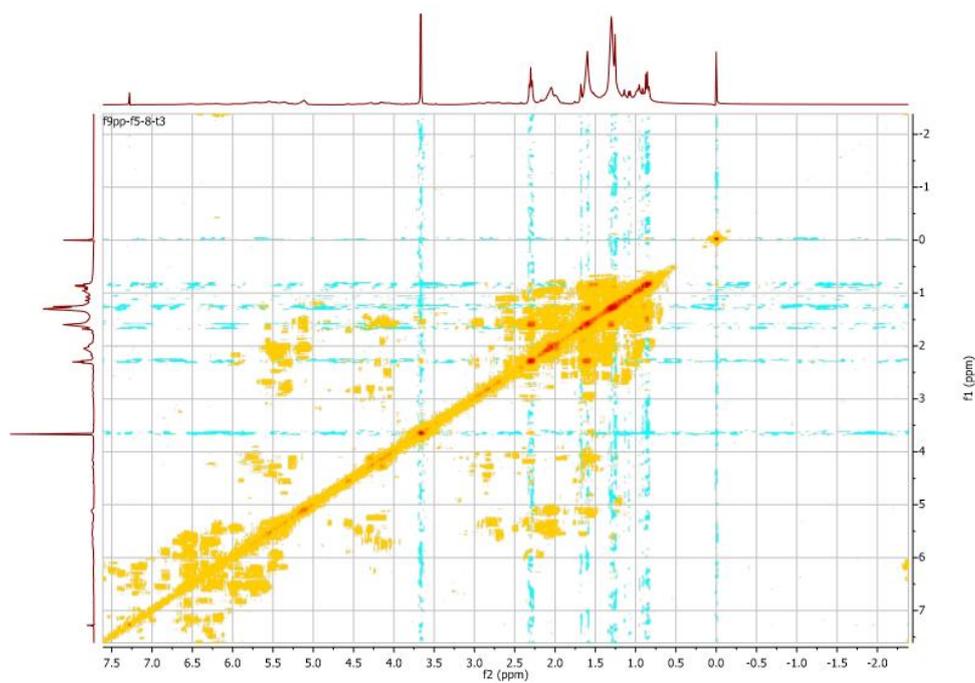


FIG 12 Anexo Espectroscopia por RMN de dos dimensiones COSY de la subfracción Fp9 proveniente de T3 F5-8.

Financiación

La investigación fue financiada por la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE) de México para una beca de viaje de GA y PRODEP Incorporación Nuevos Profesores de apoyo financiero para llevar a cabo esta investigación (FJA). El APC fue financiado por la Universidad de la República beca de profesor de tiempo completo. PEDECIBA-Biología, Duhagon MA. Becas ANII-PhD, Fort RS.

Agradecimientos

A los chamanes de Carrillo Puerto (México) por compartir sus conocimientos. A la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE) México para una beca de viaje de GA y PRODEP Incorporación Nuevos Profesores para apoyo financiero para llevar a cabo esta investigación. A PEDECIBA Uruguay por el apoyo financiero.

