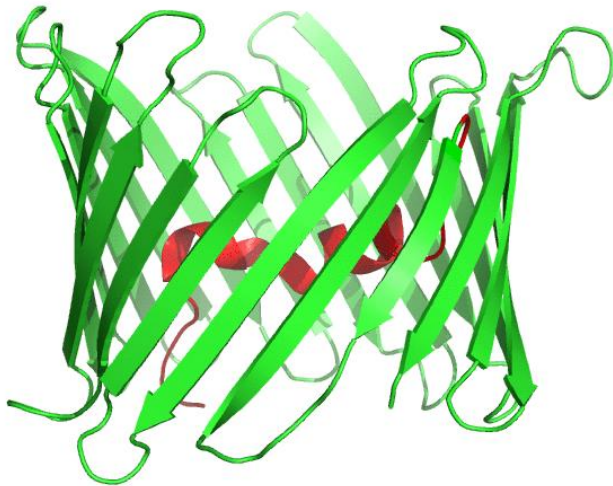


Compuestos naturales de plantas como potencial tratamiento contra el cáncer

Sr. Lic. Juan Ortas
OSIGMA Cell & Genetic
Grupo LABECO



25 de mayo de 2022

Objetivos

- Explorar la actividad anticancerígena de extractos vegetales definidos utilizando células en cultivo y un modelo de cáncer en ratón
 - Explorar el mecanismo de acción del extracto vegetal
 - Identificar los compuestos activos del extracto vegetal seleccionado implicados en la muerte celular, mediante análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), LC-MS/MS y TLC
- Evaluar el efecto del extracto vegetal y de los compuestos activos seleccionados
e identificados en un modelo de cáncer en ratón

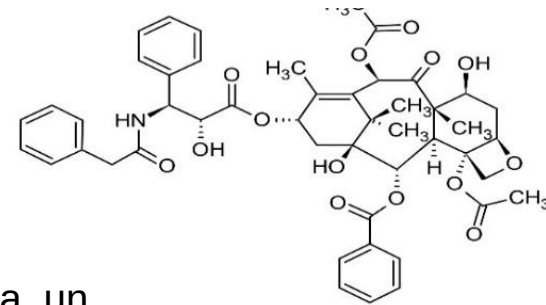
Compuestos naturales y tratamiento del cáncer



- Sustancia producida por un organismo vivo, como plantas, animales o microorganismos.
- La química farmacéutica suele restringir esta definición a los metabolitos secundarios, compuestos naturales que no son esenciales para la supervivencia o el desarrollo del organismo, pero proporcionan una ventaja evolutiva.
- Muchos metabolitos secundarios son citotóxicos; aun así, estos compuestos presentan un alto índice de seguridad y pueden

utilizarse como tratamiento contra el cáncer.

- Taxol (= Paclitaxel), producido a partir de la corteza del tejo del Pacífico —*Taxus brevifolia*—,
- se utiliza habitualmente como quimioterapia.
- En 2015 se otorgó el Premio Nobel a la Prof. Youyou Tu por su descubrimiento de la artemisinina, un compuesto natural producido por la planta *Artemisia annua*, para tratar la malaria y también estudiado contra el cáncer (cáncer de mama).



Extractos de plantas utilizados en este estudio:

A

? Ácido carnósico
? Carnosol



Salvia Rosmarinus

B



Baccharis articulata

C

? Ácido ursólico



Plantago major

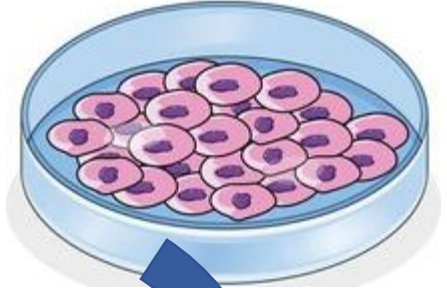
➤ Ursolic acid

Se obtuvieron extractos vegetales etanólicos

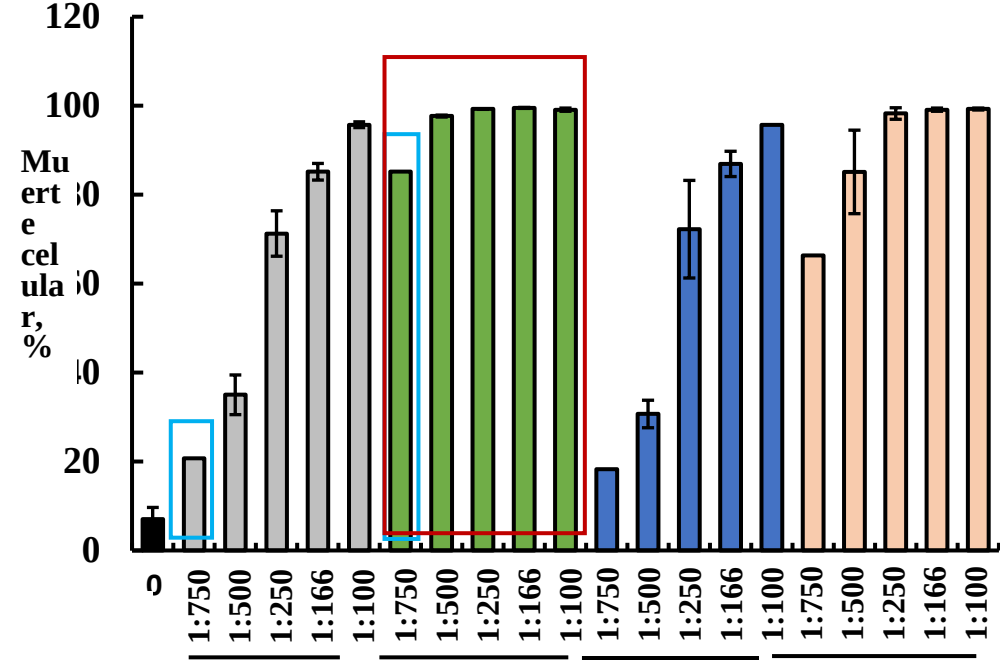
Ethanollic plant extracts were obtained



El extracto vegetal induce la muerte celular en células de neuroblastoma

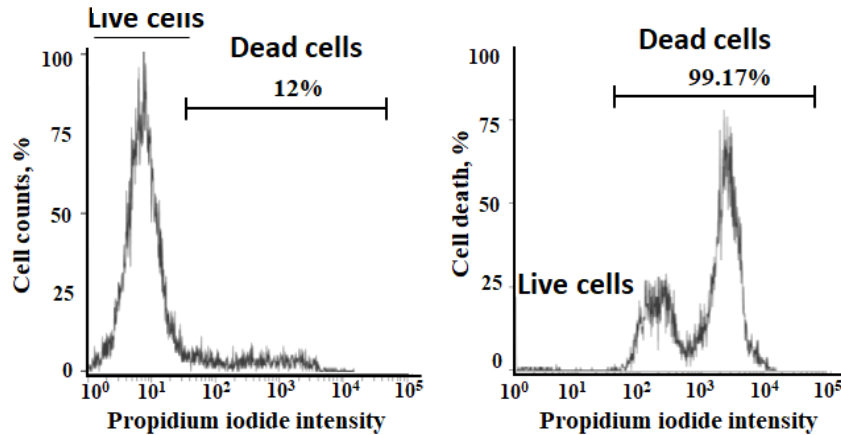


Extracto vegetal A (1:500) Células control



Mezcla A B C
Extracto vegetal:

Enfoque en
Solución A



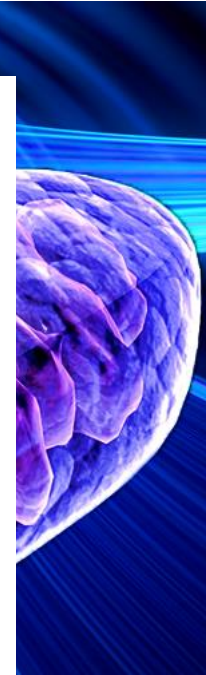
Mitocondria – central energética de la célula

Vida

- Síntesis de ATP
- Oxidación de ácidos grasos
- Oxidación de aminoácidos
 - Homeostasis del Ca^{2+}
 - Estado redox celular
 - Control del pH
- Síntesis de colesterol
- Proteínas del grupo hemo/proteínas hierro-azufre

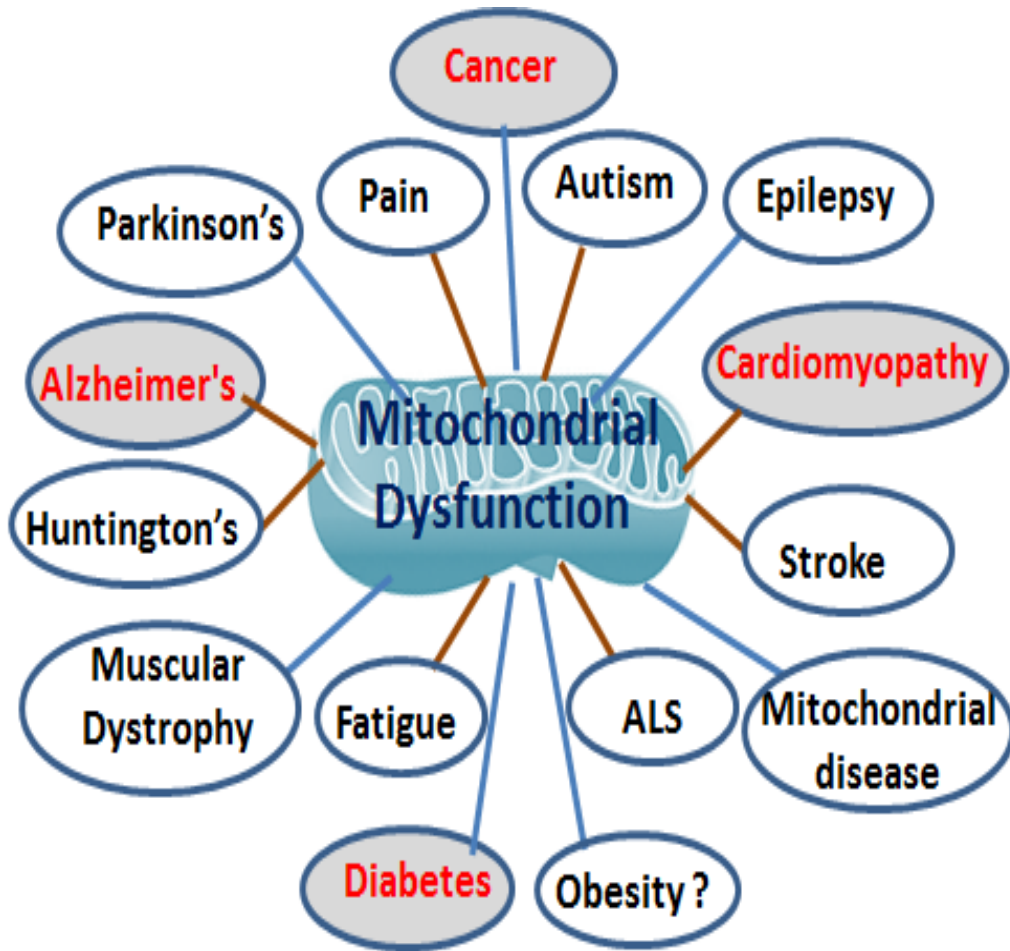
Muerte

- Pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y del metabolismo energético
- Alteraciones en el estado redox celular
- Fuente de radicales libres
- Liberación de factores apoptóticos

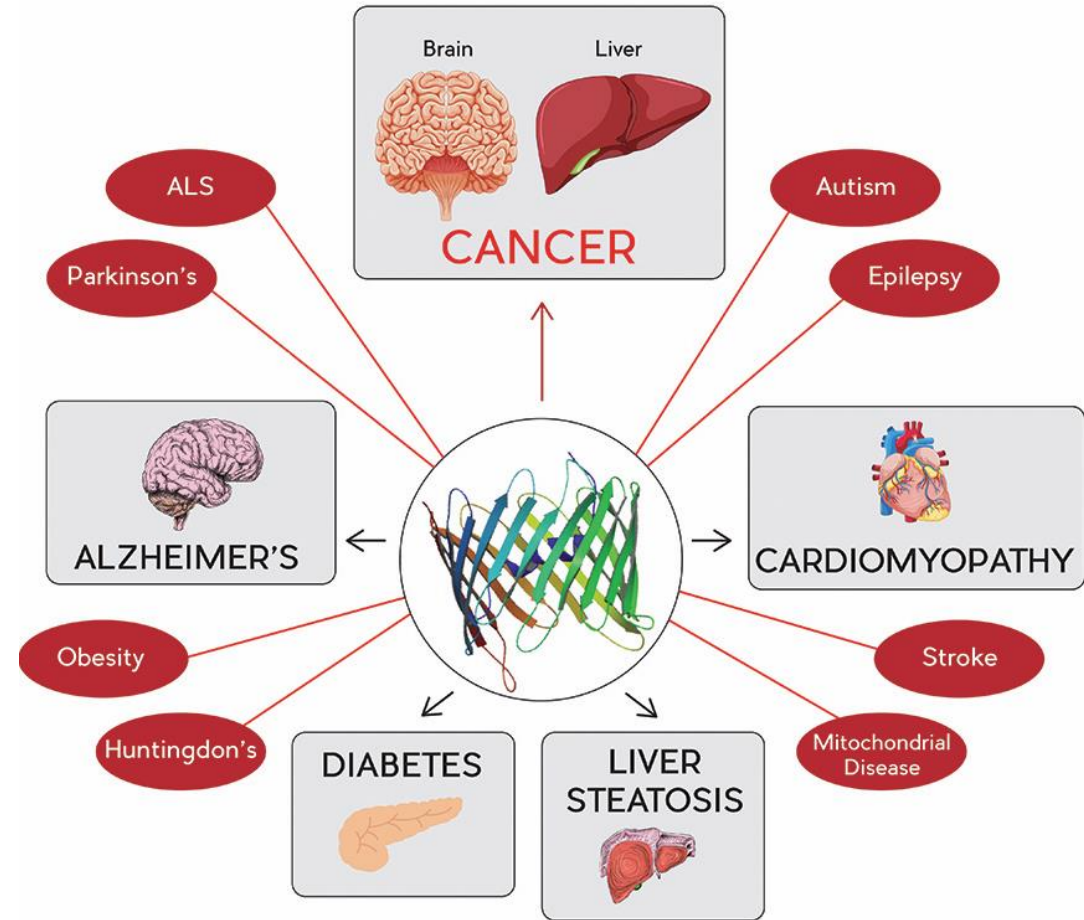


Distfuncion mitocondrial, VDAC1 y
enfermedades asociadas

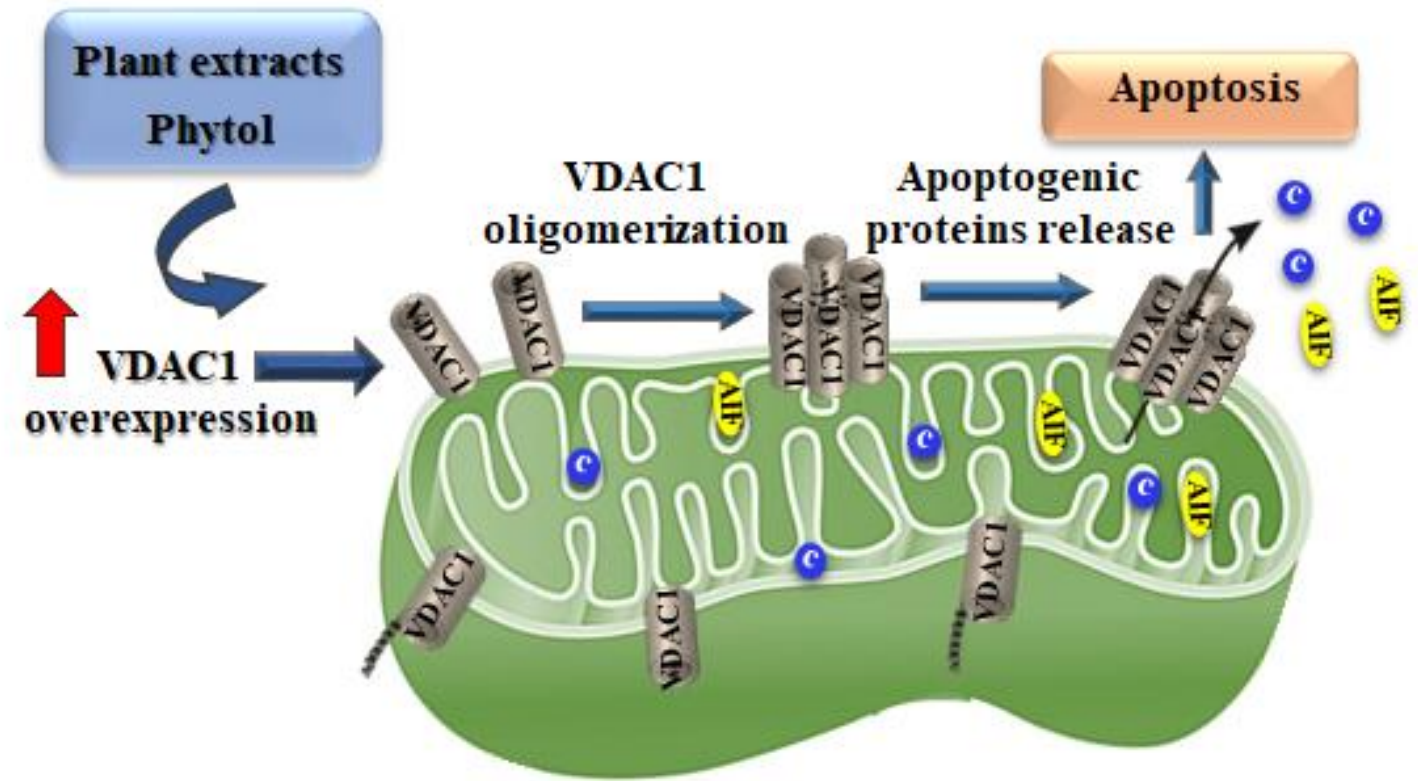
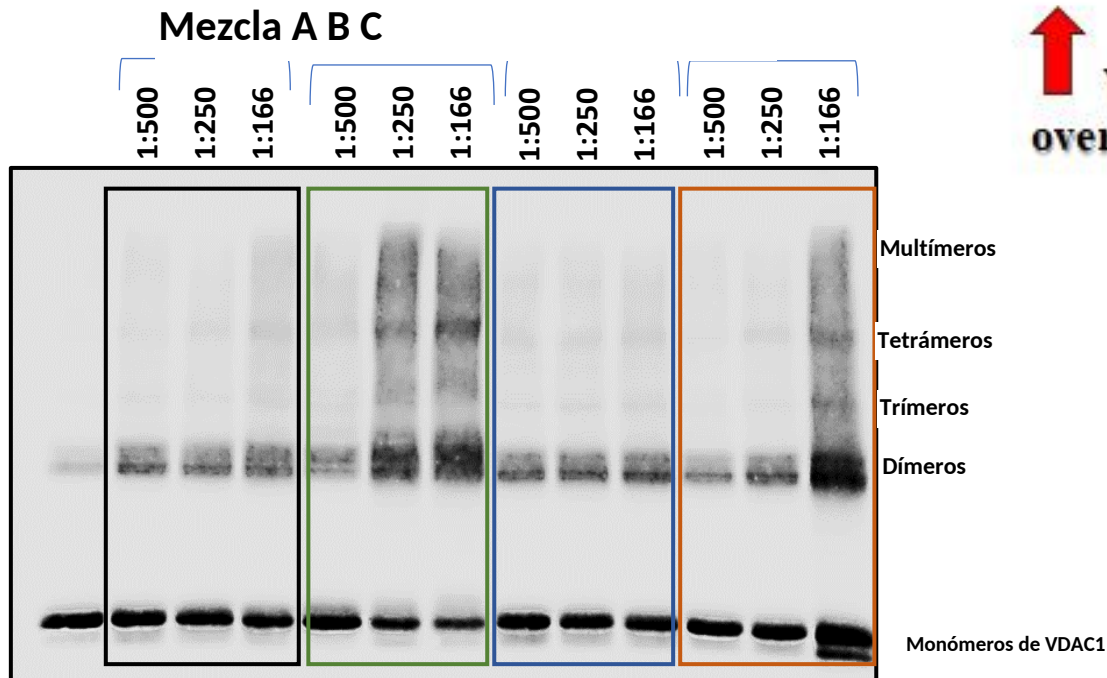
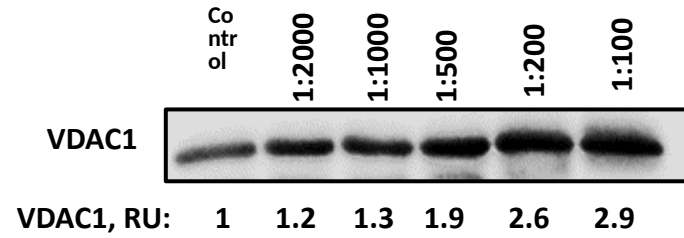
associated diseases



VDAC1 Associated Disease



Mecanismo de acción de los extractos vegetales: aumento de los niveles de expresión de VDAC1, oligomerización de VDAC1 y apoptosis

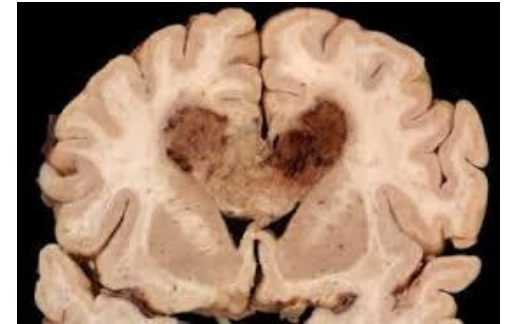


Glioblastoma – cáncer cerebral

- El tumor cerebral maligno primario más frecuente y agresivo en humanos
- No existe cura; el tratamiento actual incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia
- Supervivencia media: 12-18 meses (3,4 %-5 años)
- No existe una mutación común (hasta un 5 %)
- El tumor presenta una marcada heterogeneidad; no existe una terapia dirigida
- La recurrencia y el mal pronóstico se deben a las células madre del glioma (GSCs) residuales,

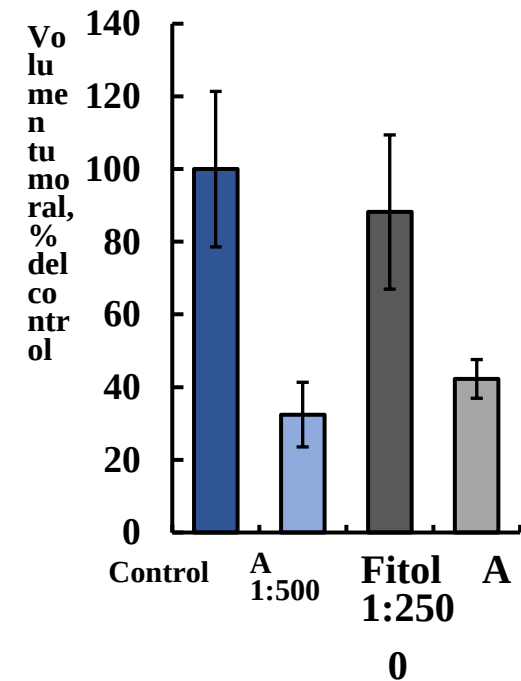
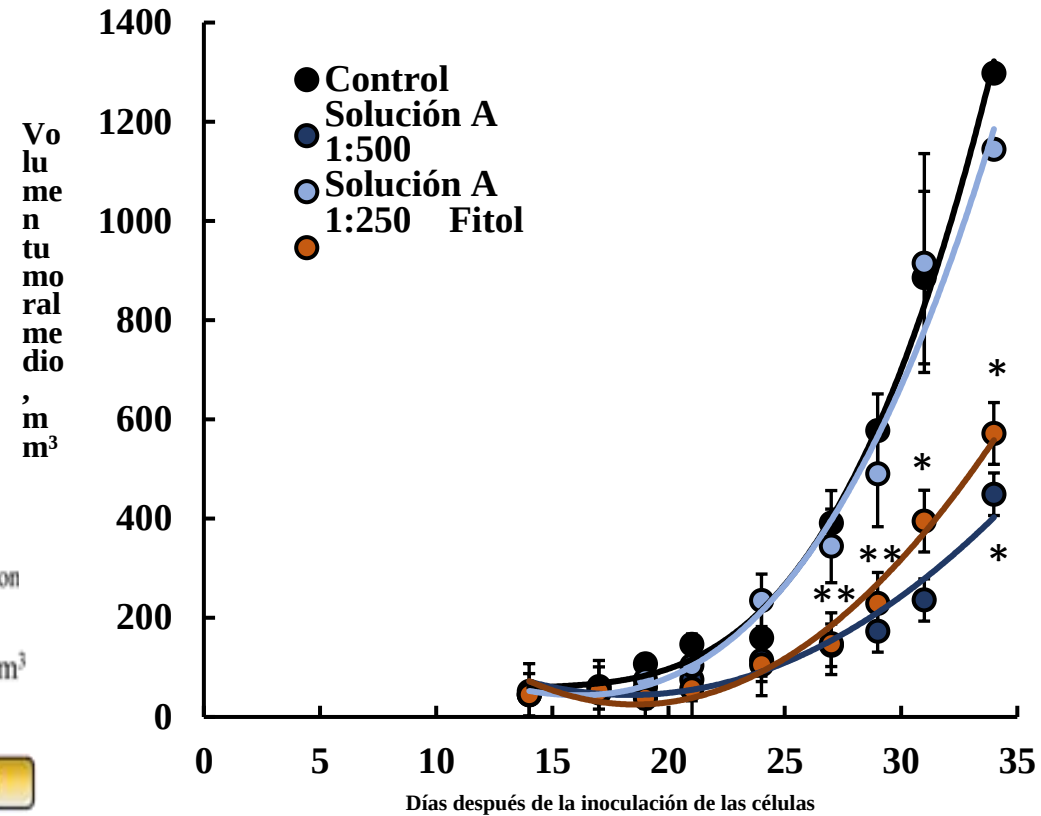
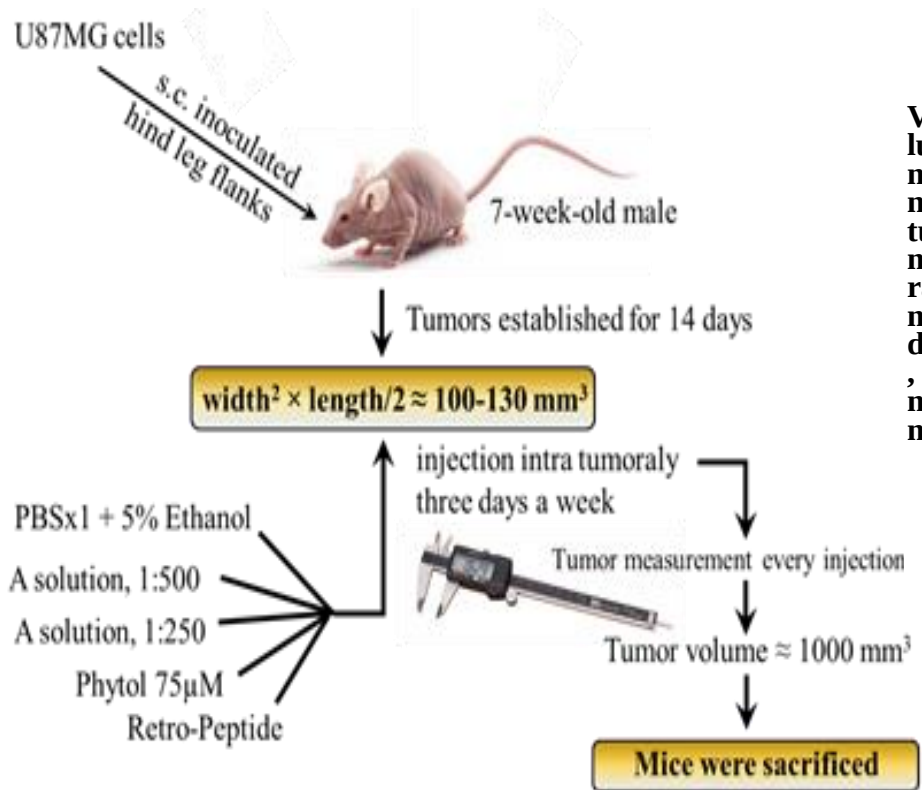
altamente resistentes a la radiación

VDAC1 está sobreexpresado en GBM

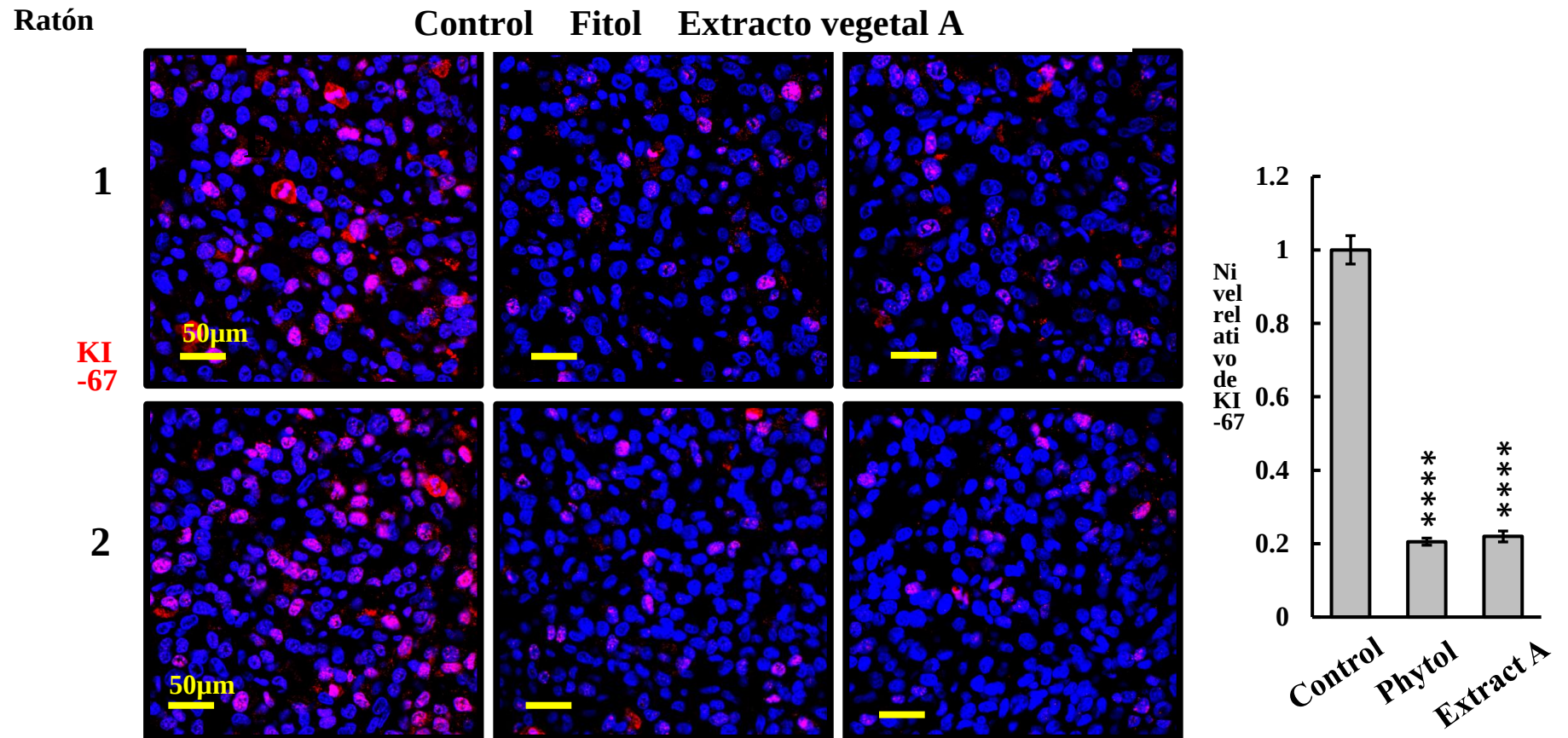
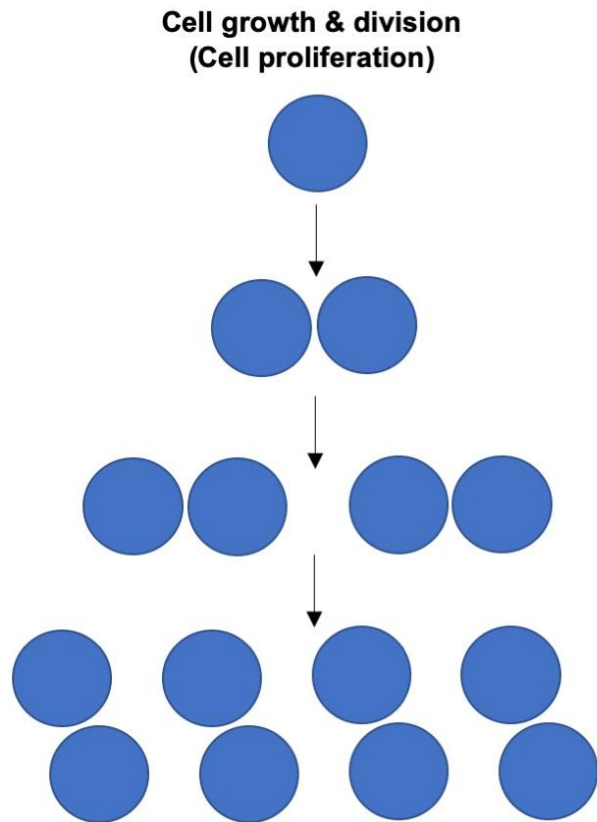


and phytol in a glioblastoma mouse model

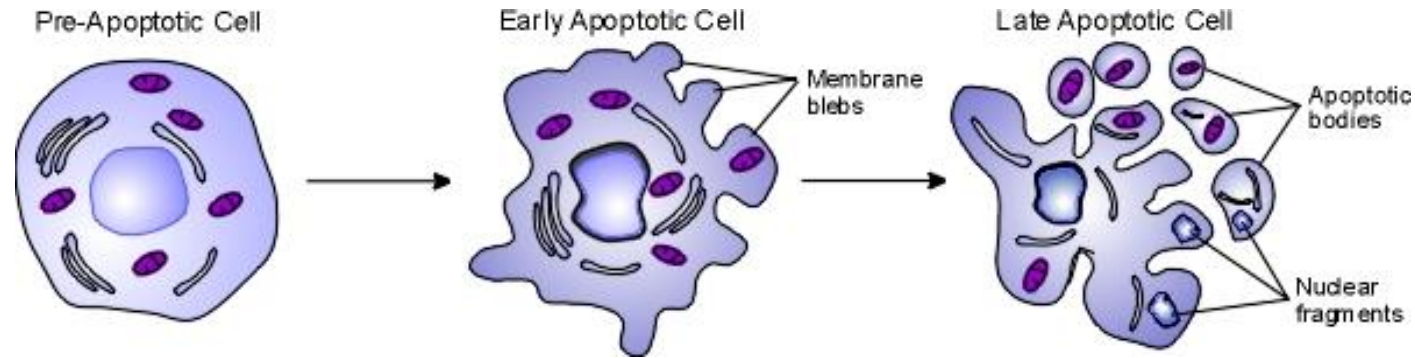
Los volúmenes tumorales medios calculados en función del tiempo se presentan como medias $\pm$ SEM.



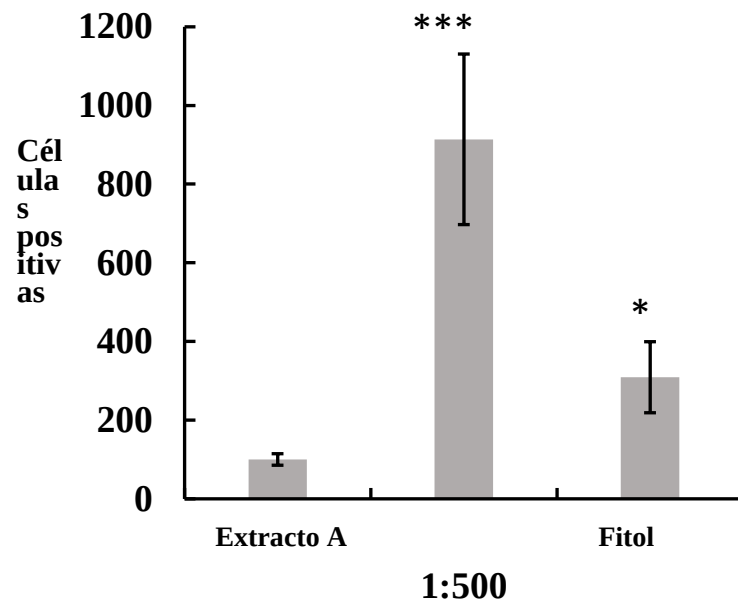
la división y el crecimiento celular por el extracto vegetal y el fitol en modelos de xenoinjerto en ratón



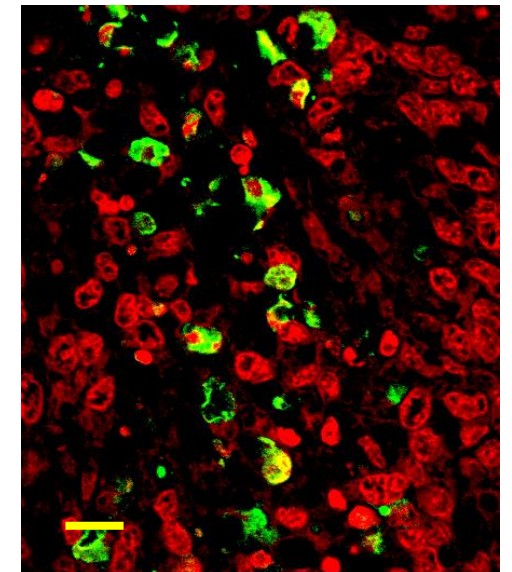
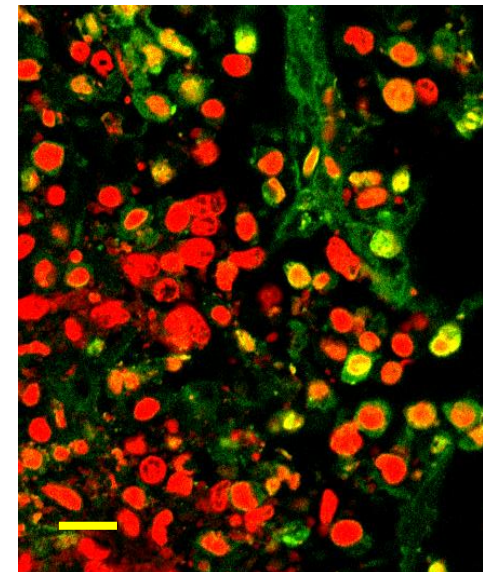
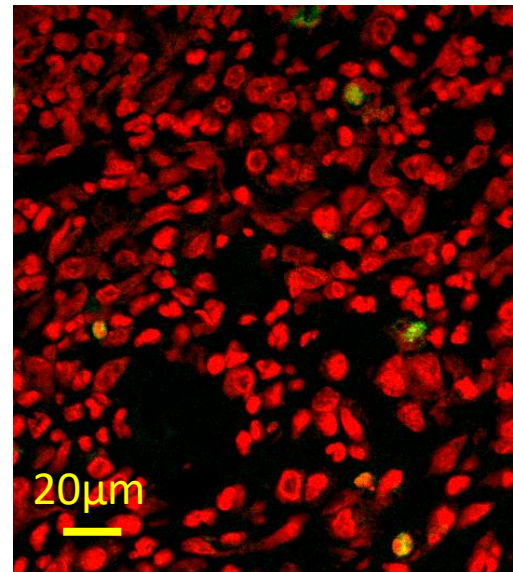
El extracto vegetal A y el fitol inducen la muerte celular en un modelo de xenoinjerto en ratón



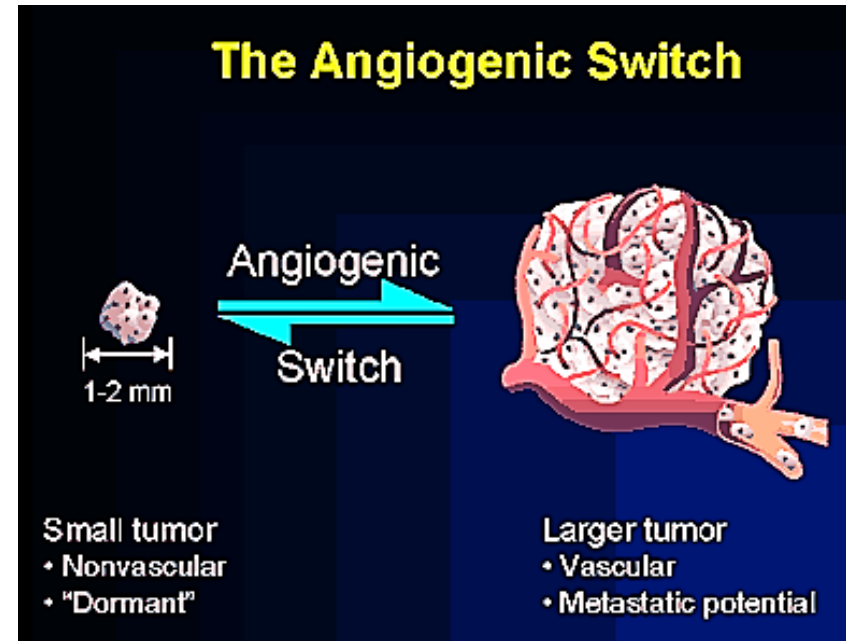
Control Extracto vegetal A Fitol



TUNEL

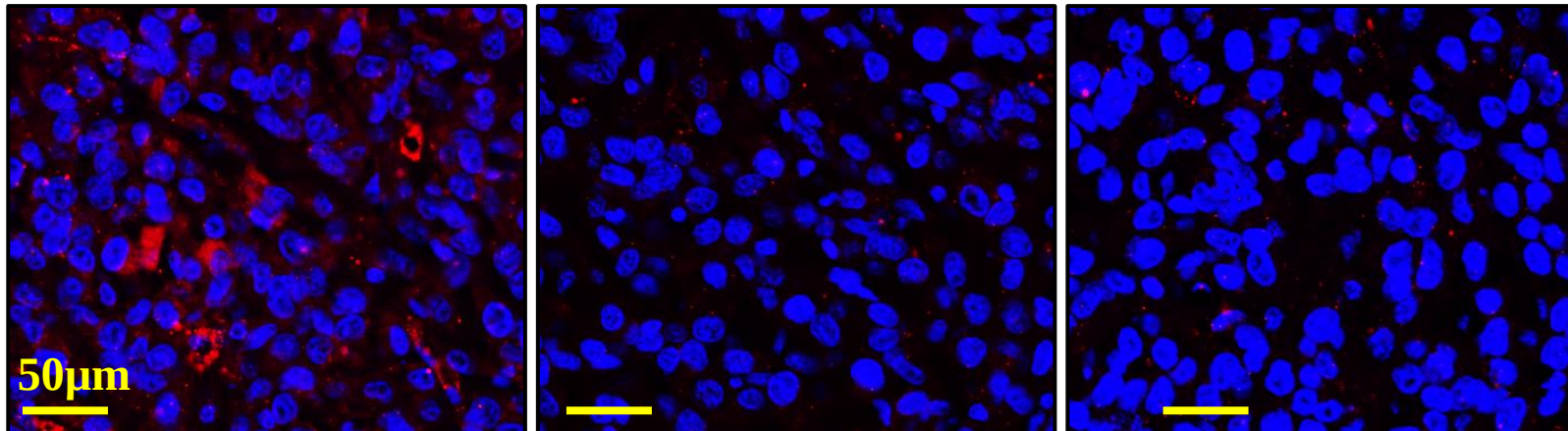


El extracto vegetal A y el fitol alteran el microambiente tumoral en un modelo de xenoinjerto en ratón



Angiogenesis

CD31 Control Extracto vegetal A Fitol

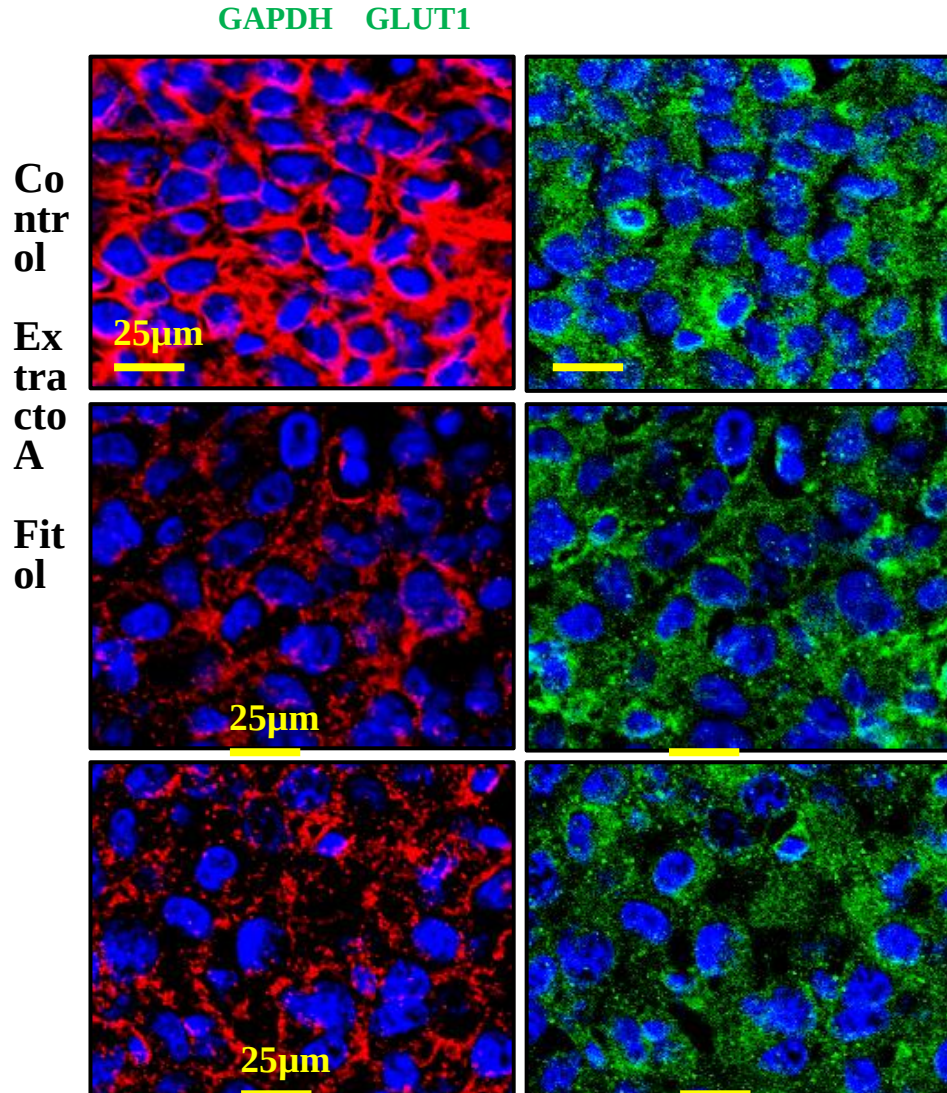
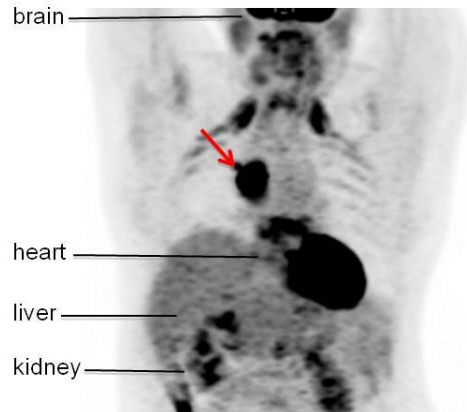


El extracto vegetal A y el fitol inhiben el metabolismo



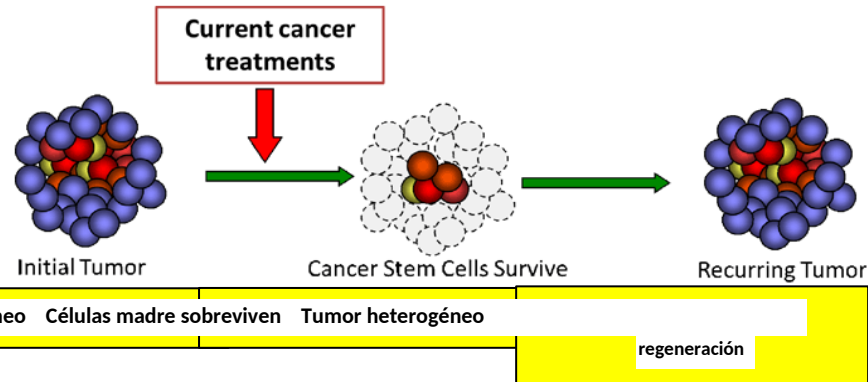
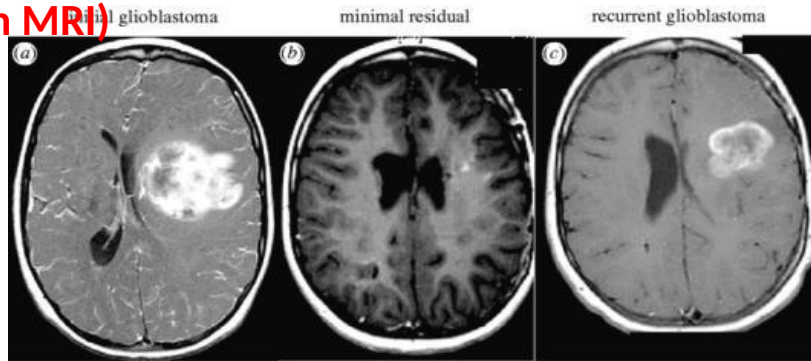
Hipótesis de Warburg (1924):
«La causa principal del cáncer es el reemplazo de la respiración del oxígeno en las células normales por la fermentación del azúcar»

PET Scan
18-fluorodesoxiglucosa (FDG)



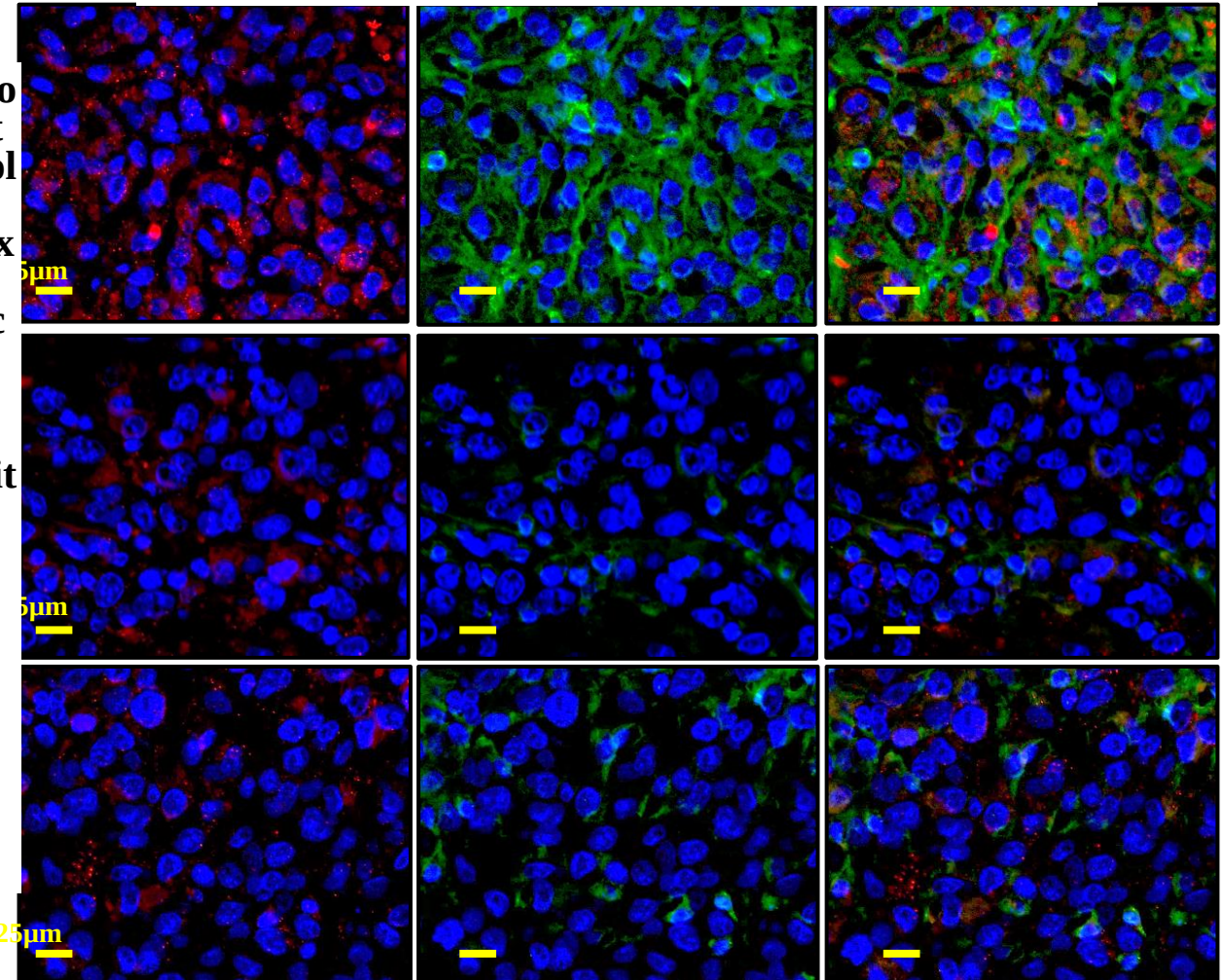
El extracto vegetal A y el fitol reducen las células madre cancerosas en un modelo de xenoinjerto en ratón

Resonancia
magnética cerebral
(Brain MRI)



SOX2 Merge Nestin

Control
Extracto A
Fitol



Resumen y conclusiones:

- El extracto vegetal A revierte las propiedades oncogénicas de las células cancerosas y puede reemplazar varios fármacos, cada uno de los cuales ataca un único proceso

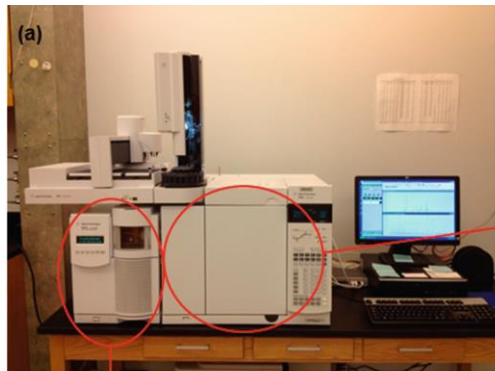
Reversión de las propiedades oncogénicas mediante:

- ❖ Inhibición de la producción de energía celular
 - ❖ Inhibición de la proliferación celular
 - ❖ Inhibición de la angiogénesis
- ❖ Eliminación de las células madre cancerosas (stemness), reduciendo así la recurrencia

Identificación de los compuestos activos en los extractos vegetales

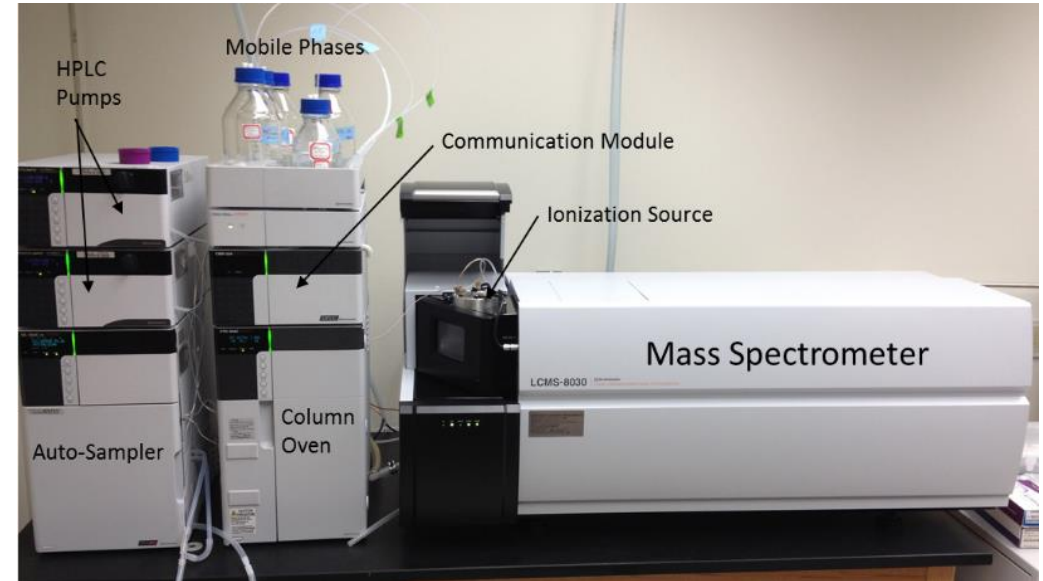
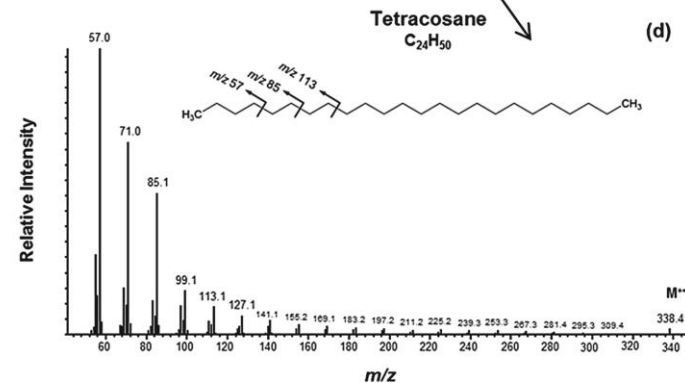
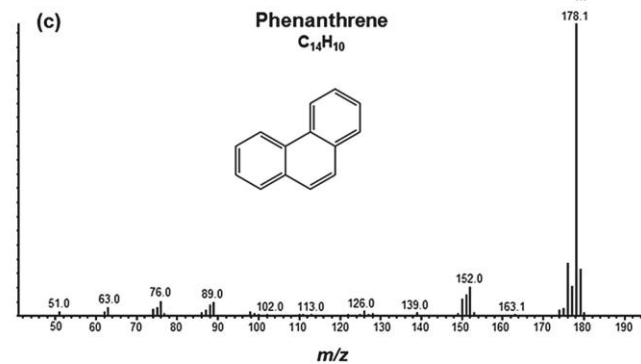
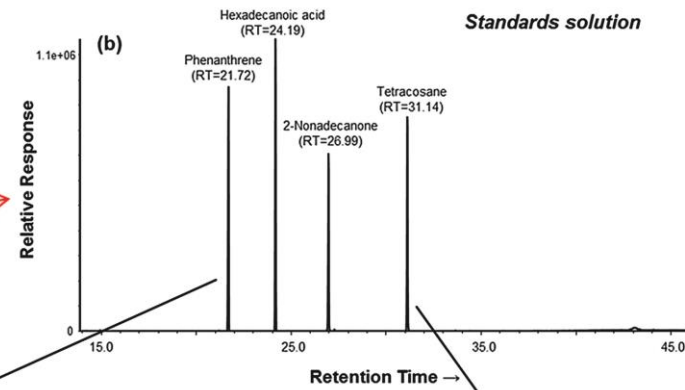
Análisis mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

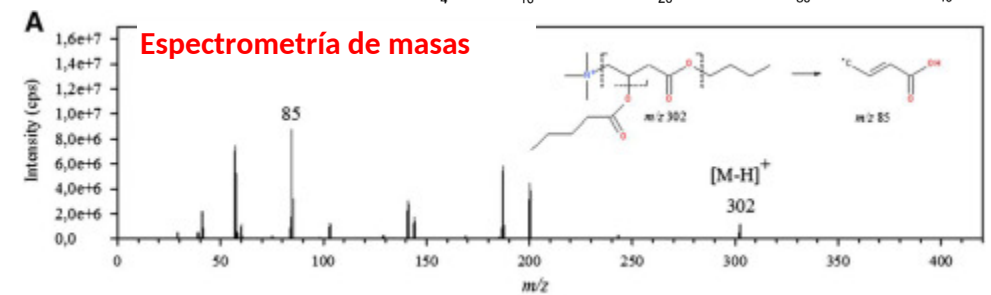
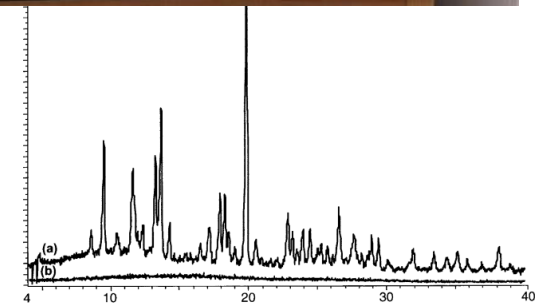


GC

MS



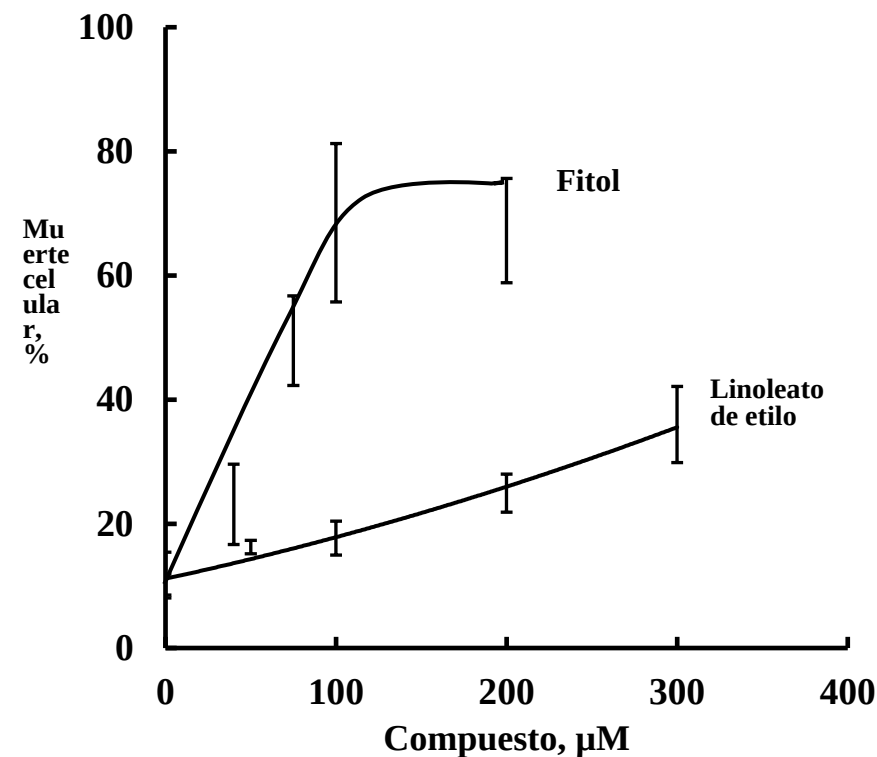
Cromatografía líquida



Análisis mediante cromatografía de gases–espectrometría de masas (GC-MS)

del extracto vegetal (A, B, C)

El análisis mediante GC-MS identificó aproximadamente 20 compuestos en los extractos A, B y C, respectivamente

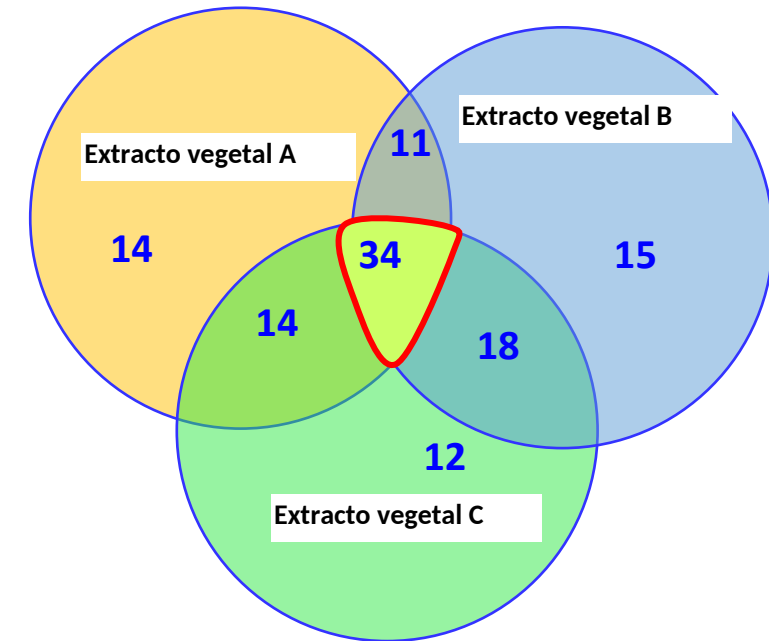
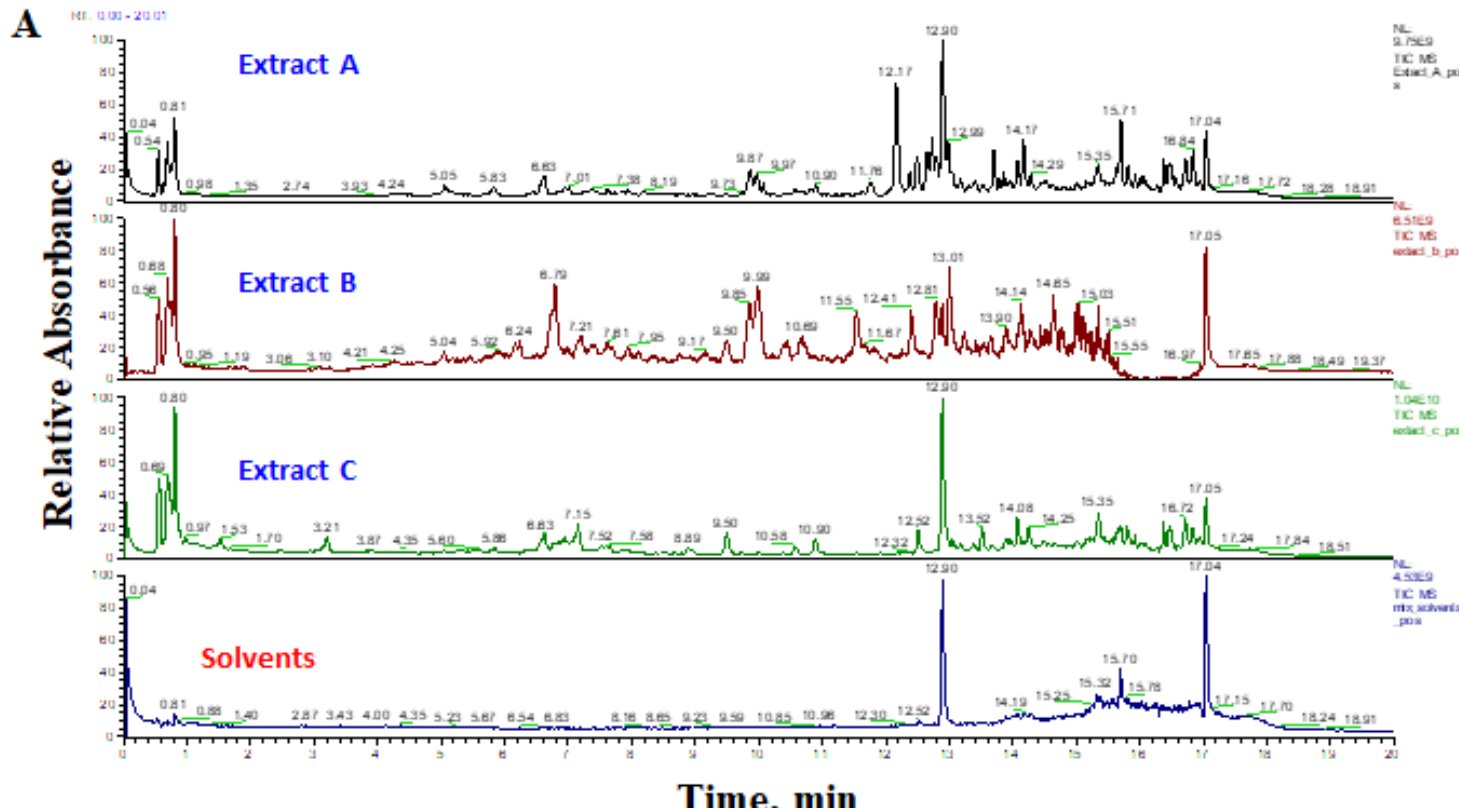


	A	B	C
Ácido hexadecanoico, éster etílico	++ + +++		
Fitol	++ + ++		
Ácido linoleico, éster etílico	++ + +++		
Linoleato de etilo = ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster etílico	++	+	+++
Ácido octadecanoico, éster etílico	+ - +		
4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil	-	++	++

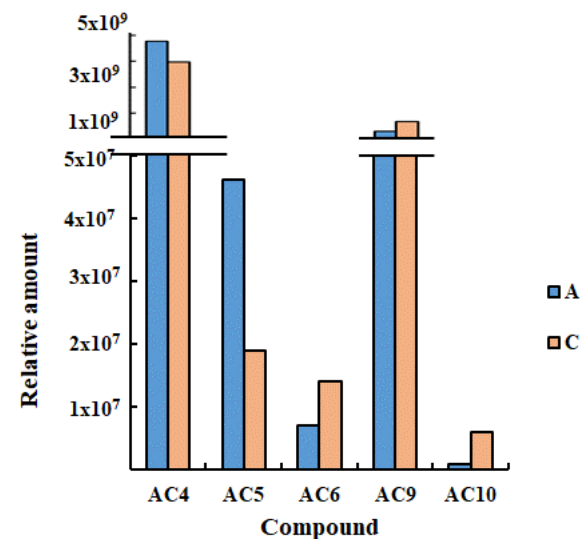
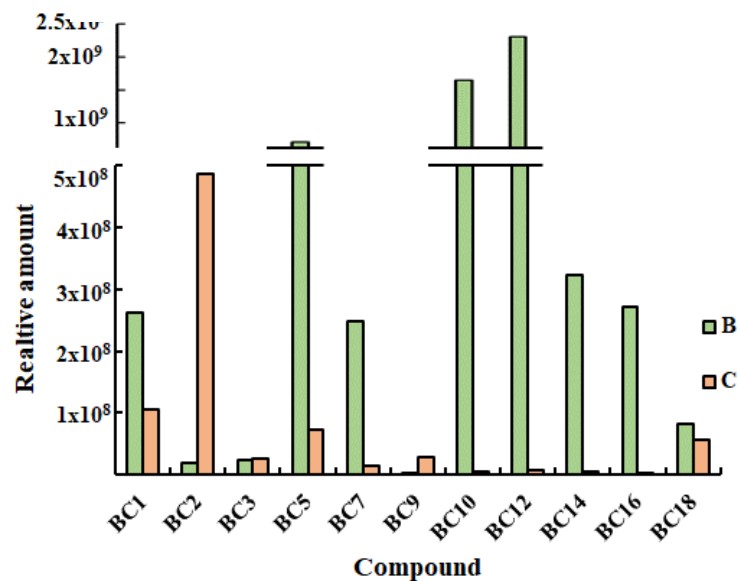
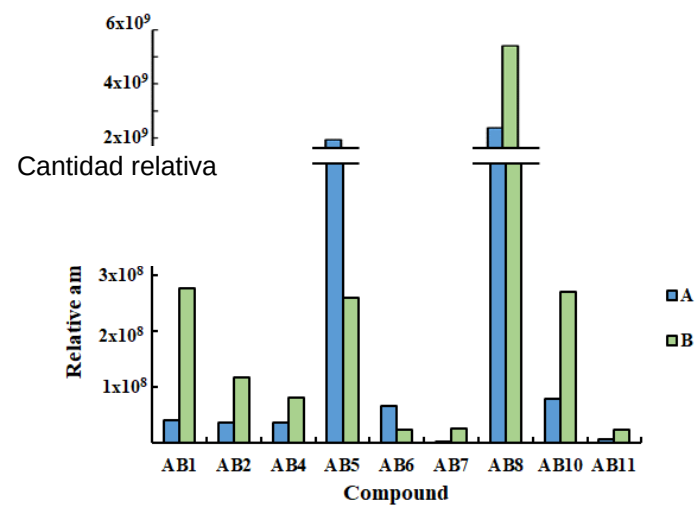
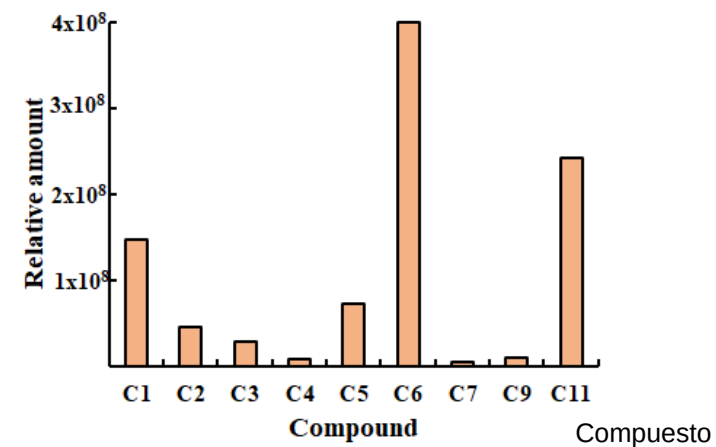
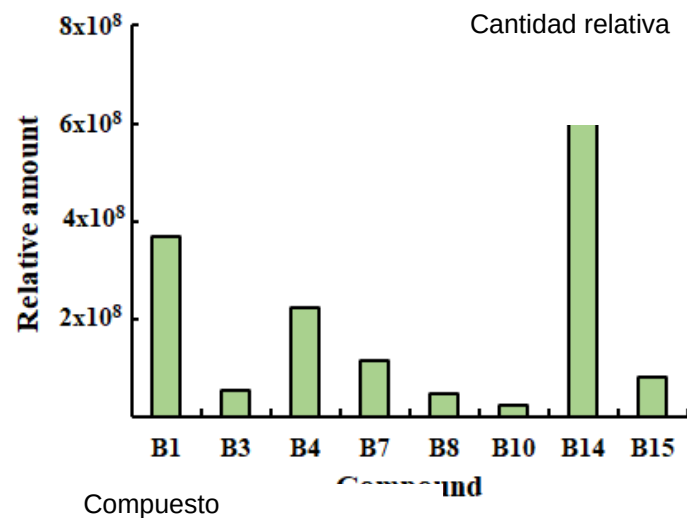
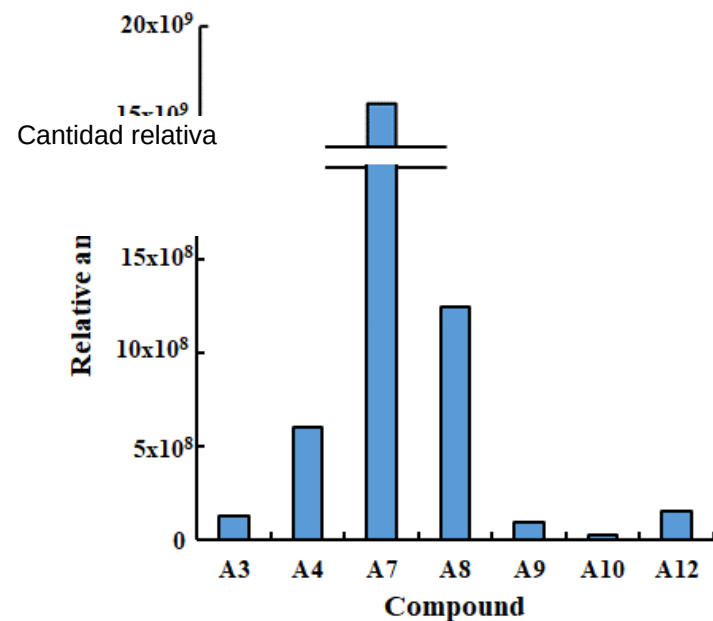
Cromatogramas obtenidos mediante LC-MS/MS que muestran los compuestos identificados en el extracto vegetal A (A), el extracto vegetal B (B) y el extracto vegetal C (C)

ABC – 34
compuestos
11 AC – 14 BC –
18

A – 14 compuestos
B – 15 C – 12



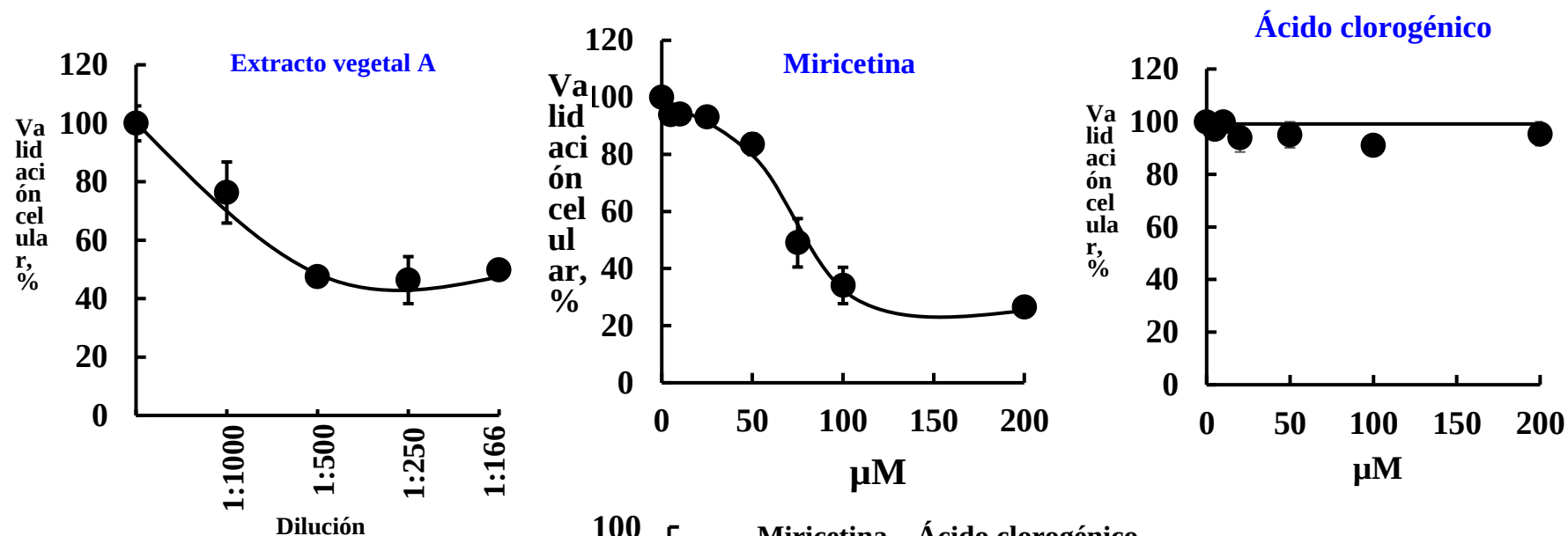
El análisis mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) del extracto vegetal A produjo 164 compuestos



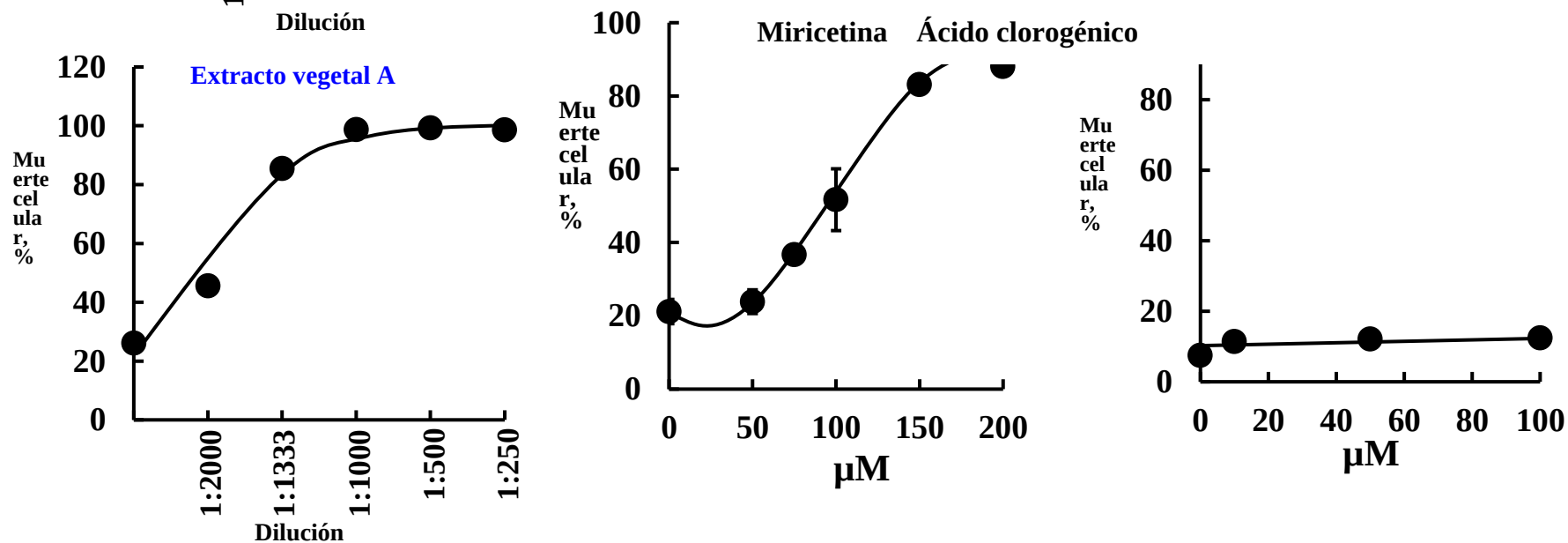
Compuesto

identificados en el extracto vegetal A mediante LC-MS/MS

XTT

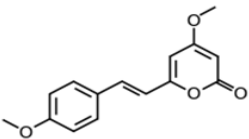


Apoptosis



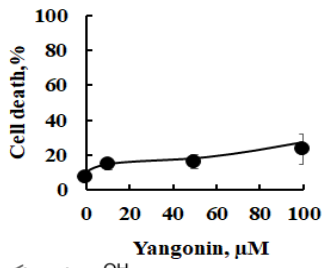
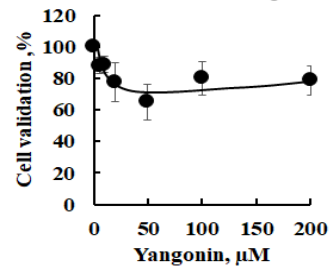
identificados en el extracto vegetal A mediante LC-MS/MS

Yangonin

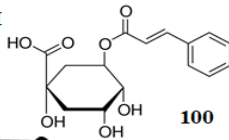


Apoptosis

XTT

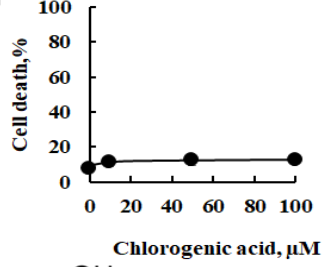
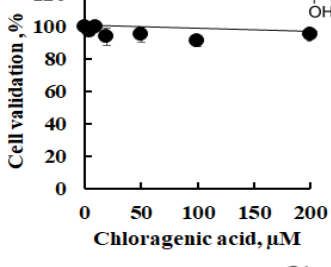


Chlorogenic acid

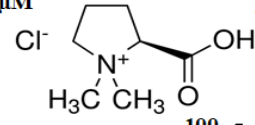


Apoptosis

XTT

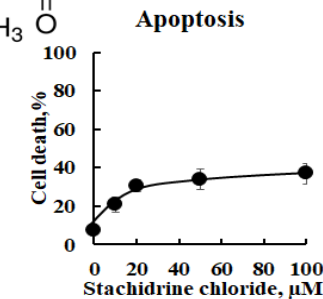
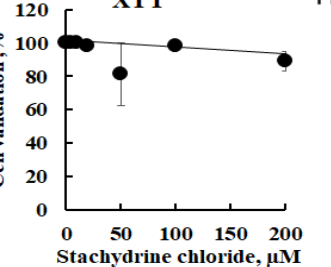


Stachydrine chloride

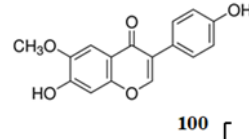


Apoptosis

XTT

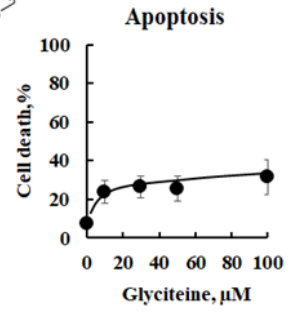
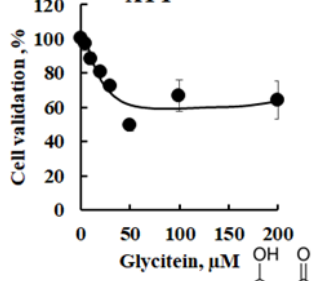


Glycitein

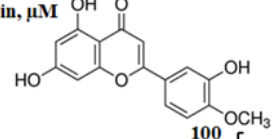


Apoptosis

XTT

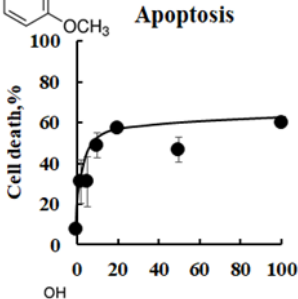
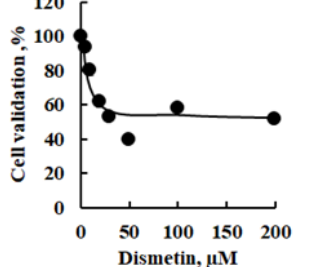


Diosmetin

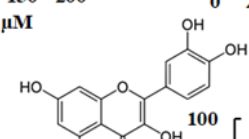


Apoptosis

XTT

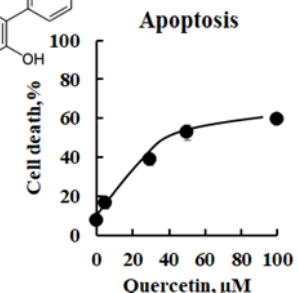
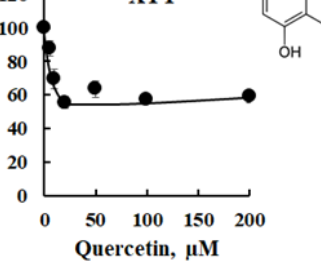


Quercetin

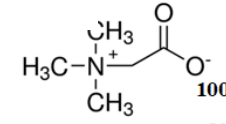


Apoptosis

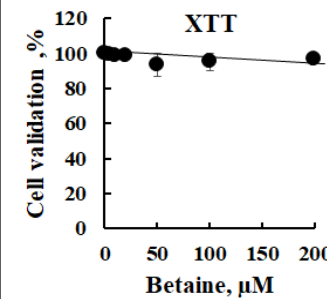
XTT



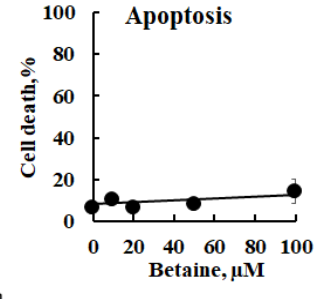
Betain



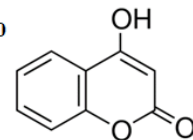
XTT



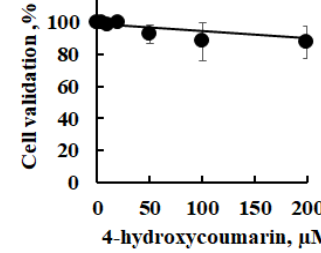
Apoptosis



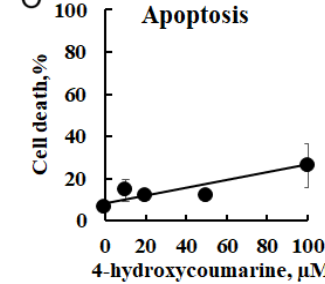
4-hydroxycoumarin



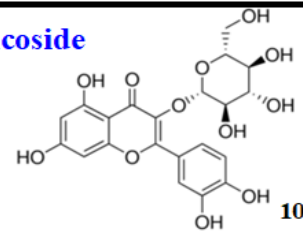
XTT



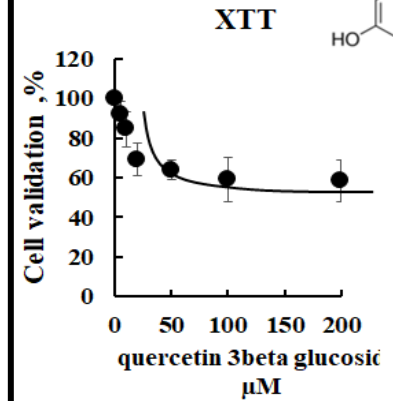
Apoptosis



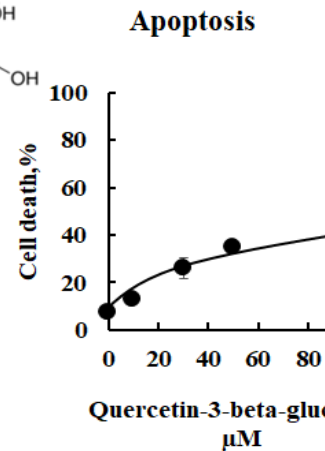
Quercetin-3-beta-glucoside



XTT



Apoptosis



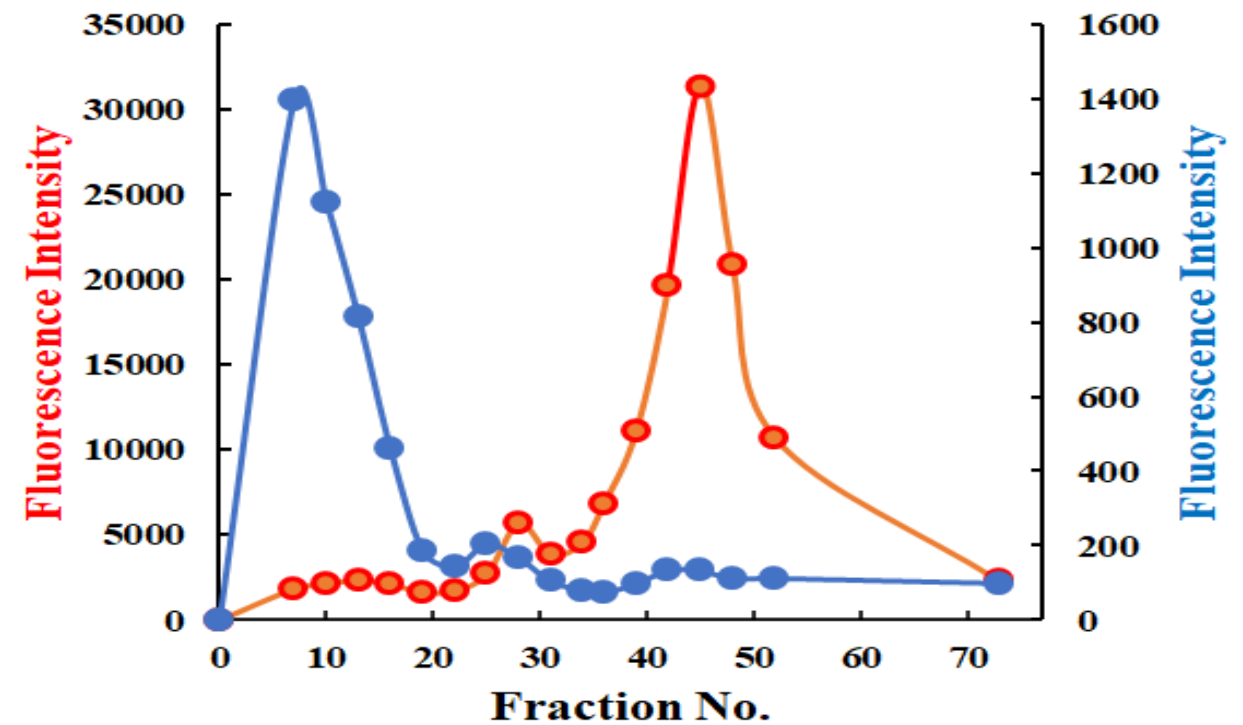
Resumen de los efectos sobre la supervivencia celular y la inducción de apoptosis de los compuestos seleccionados identificados en el extracto A mediante análisis LC-MS/MS

	Compuesto	PM, Dalton	Fórmula empírica	Muerte celular máxima, %	Concentración para la muerte celular máxima, µM	Apoptosis IC50, µM	Supervivencia celular, %	Concentración para la máxima inhibición de la supervivencia, µM	Supervivencia IC50, µM
	Extracto vegetal A	99		1:1000 dilución (98 % de muerte)		46,33	1:250 dilución	1:500 dilución	
1	Rutina	610,52	C27H30O16 · 3H2O	74	400	350 ~			
2	Kaempferol	286,24	C15H10O6	72	300	100	47,16	300	200 ~
3	Miricetina	318,24	C15H10O8	88	200	100	26,4	200	60?75
?	Ácido cafeico	180,16	C9H8O4	90	700	500	23,62	1000	750
?	Ácido rosmarínico	360,31	C18H16O8	23	600<	~250	75,7	300<	35 ~
?	Yangonina	258,27	C15H14O4	23	100<<	?	64,9	20	5?10
?	Ácido clorogénico	354,31	C16H18O9	12	100<<	?	91	200<	?
?	Betaína	117,15	C5H11NO2	14	100<<	?	95,1	200<	?
?	4-hidroxycumarina	162,14	C9H6O3	26	100<<	?	87,3	200<	?
1?	Cloruro de estaquidrina	179,64	C7H14ClNO2	37	50	10	81,3	200<	?
11	Cloruro de cianidina	322,7	C15H11ClO6	38	20	5	91,8	200<	?
12	Gliciteína	284,26	C16H12O5	31	30	4*	64	200	20
13	Dismetina	300,26	C16H12O6	60	20	5*	51,2	200	~15
1?	8-hidroxiquinolina	145,16	C9H7NO	30	10	3*	48,6	50	15~

Cromatografía en columna: columna de sílica gel

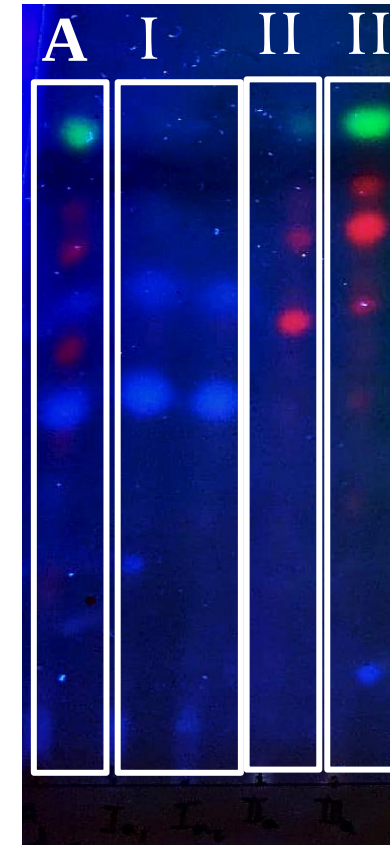
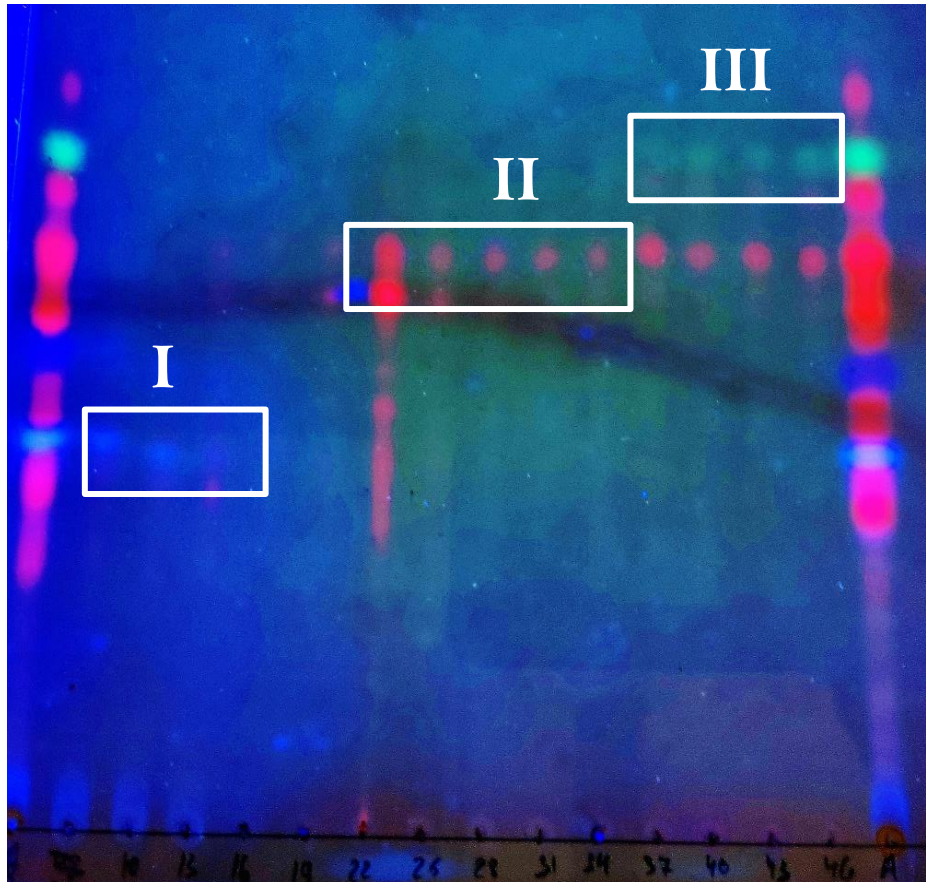


Cromatografía en columna: sílica gel, tamaño de partícula de 40–75 μm . Disolvente: etanol en diferentes concentraciones: 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 75 %



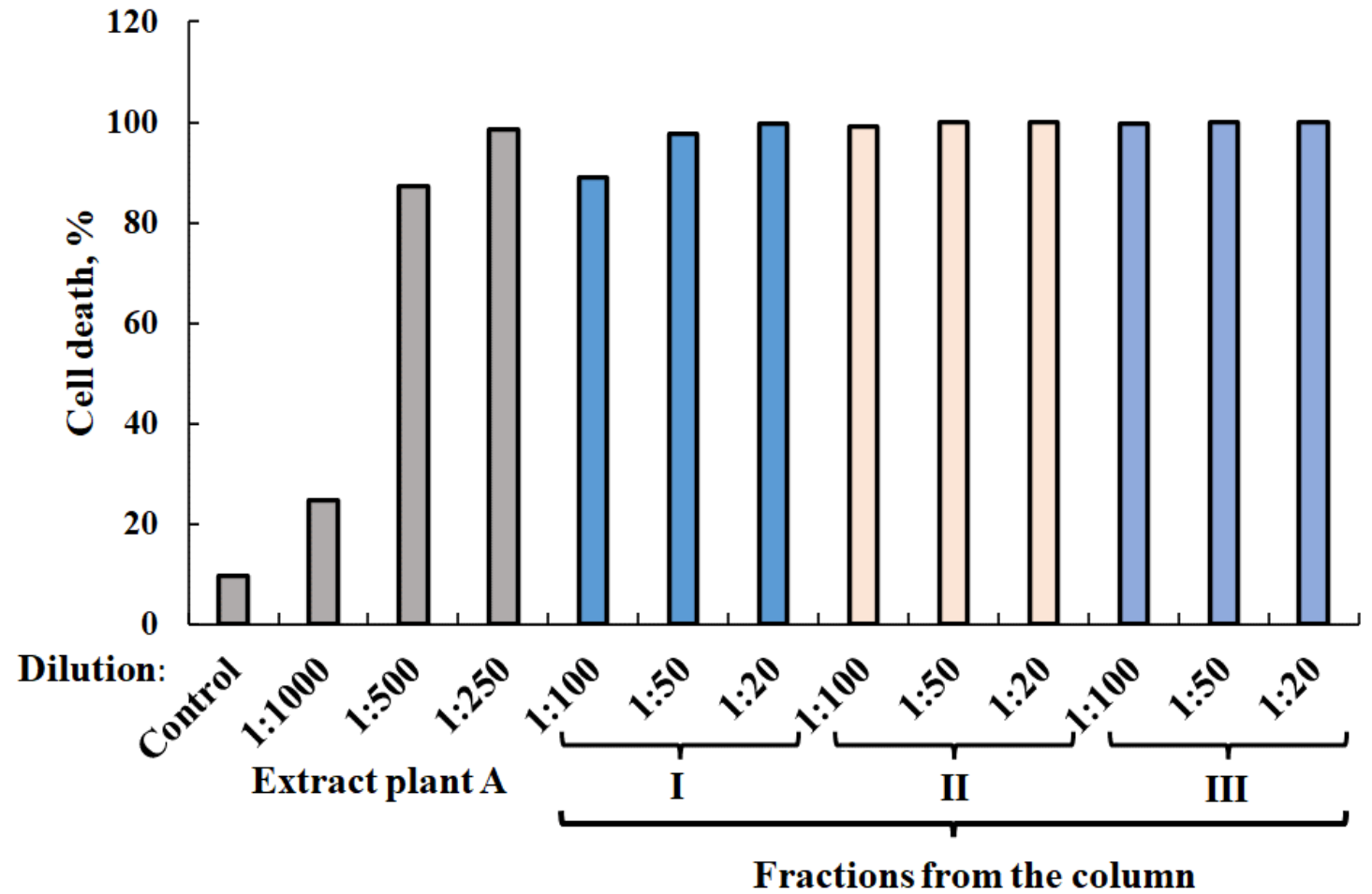
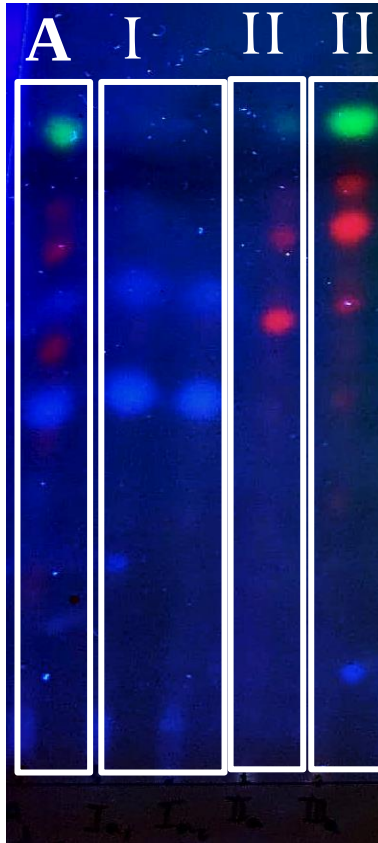
Purificación parcial de compuestos potencialmente activos en el extracto vegetal mediante columna de sílica gel

Diferentes fracciones de la columna:



Tolueno: acetato de etilo: cloroformo: ácido fórmico 6:6:4:1

Actividad sobre la muerte celular de las fracciones de la columna



Planes futuros

1. Determinar la cantidad relativa de los compuestos activos en la muerte celular entre los 16 compuestos analizados (Tabla 1) presentes en los extractos vegetales A, B y C, utilizando dos métodos: TLC y LC-MS/MS, junto con curvas de calibración utilizando compuestos comerciales disponibles.

16 tested compounds (Table 1) in plant extracts A, B, and C, using two methods TLC and LC-MS/MS and calibration curves using available purchased compounds.

2. Purificar posteriormente las moléculas aún no identificadas en las fracciones II y III de la columna y evaluar su actividad sobre la supervivencia celular y la inducción de apoptosis.

3. Evaluar los efectos de estos compuestos, en las concentraciones determinadas dentro del extracto vegetal, sobre la supervivencia celular, y evaluar diferentes combinaciones para determinar si existe algún efecto sinérgico.

the plant extract on cell survival tested, and to test their different combinations to see if there is any synergic effect.

4. Evaluar los compuestos más activos y la combinación más activa sobre el crecimiento del cáncer cerebral en un modelo de xenoinjerto subcutáneo en ratón.

cancer growth in a subcutaneous xenograft mouse model.

Instituto Nacional de
Biotecnología del Néguv
¡Gracias!



Edificio NIBN



