



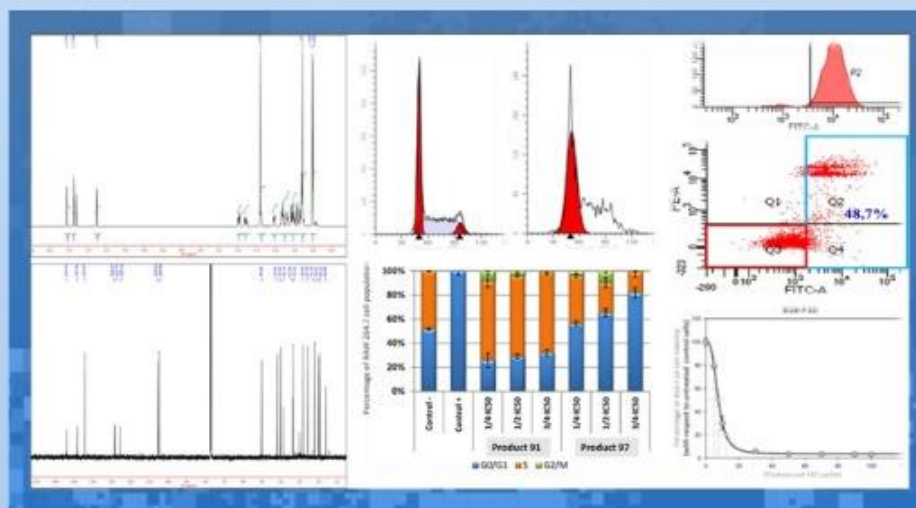
UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

Departamento de Química Orgánica

Programa de Doctorado en Biología fundamental y  
de sistemas

# SÍNTESIS DE TERPENOIDES EN BÚSQUEDA DE NUEVOS PRODUCTOS ANTITUMORALES

TESIS DOCTORAL



HOUDA ZENTAR

GRANADA, 2021



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Orgánica**

**Programa de Doctorado en Biología fundamental y de sistemas**



**SÍNTESIS DE TERPENOIDES EN BÚSQUEDA DE NUEVOS PRODUCTOS  
ANTITUMORALES**

Tesis doctoral para aspirar al grado de Doctor en Biología presentada por:

**M<sup>a</sup> HOUDA ZENTAR**

Bajo la dirección del doctor

Rachid Chahboun Karimi

**GRANADA, 2021**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Houda Zentar  
ISBN: 978-84-1306-900-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69095>

Esta Tesis doctoral ha sido realizada gracias a un proyecto concedido por el ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CTQ2014-56611-R/BQU), y a la financiación a cargo del grupo de investigación FQM-348 “Productos Naturales y Síntesis Orgánica Aplicada”

## **Agradecimientos**

Con motivo de la presentación de esta memoria, y a pesar de la dificultad que supone encontrar las palabras adecuadas cuando se trata de expresar sentimientos de gratitud, aprovecharé estas líneas para expresar mis más sinceros agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer al profesor D. Rachid Chahboun Karimi por dirigir y ser el pilar fundamental de este trabajo, compartir sus amplios conocimientos y experiencias y guiarme en el complejo mundo de la investigación. Gracias por su interés, inestimable dirección y excelente trato.

También agradezco de todo corazón, al profesor D. Enrique Álvarez-Manzaneda Roldán, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, y por su extraordinaria profesionalidad y calidad humana.

Quisiera expresar, así mismo, mis agradecimientos al Dr. Fernando Jesus Reyes Zurita, por confiar en mí desde el primer momento y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por estar siempre dispuesto a resolver cualquier duda, también agradecerle su labor como docente y por todo su conocimiento sobre biología molecular.

Sin olvidar de agradecer también a Fatin Jannus, por su gran ayuda para llevar a cabo los ensayos biológicos, por su compañía animo y consejos.

Al ministerio de Economía y Competividad (proyecto CTQ2014-56611-R/BQU), por la financiación que ha permitido el desarrollo de esta tesis doctoral.

A todos mis compañeros de laboratorio quiero darles las gracias por su amistad y compañerismo, a los que se fueron y los que aún están: Fatin, Mustapha, Soumicha, Pili, Pepo, Juany, Fabio, Fermin, Hanane, por su trato amigable y por amenizar el trabajo diario. Sin olvidarme de agradecer también a los amigos que conocí durante estos años: Nabil, Chadia, Biba, Wassima, Imen, por sus charlas, ánimos y risas.

Quisiera expresar mi agradecimiento también a los miembros del centro de instrumentación científica, especialmente al Dr. Ali Haidour y a José Miguel Ramos, por la realización de espectros de RMN y masa y al Dr. Jaime Lazuen Alcón, por la realización de la técnica de citometría de flujo (FLC).

Y llegados a este punto, mi más sincero, especial y profundo agradecimiento a mi familia, por su comprensión, apoyo y paciencia durante estos años. A mis hermanos y hermanas, que a pesar de la distancia que nos separa, siempre han estado cerca de mí animándome y ayudándome con mucho cariño: Sara, Zoulikha, Halima, Temtem, Abdessamad, Abdelhafid, Abdelghafour y Soufian. Gracias, desde el fondo de mi corazón, por estar ahí y por ser esa ayuda que necesitaba en los duros y difíciles momentos.

Finalmente, manifiesto mi eterno agradecimiento a la luz que siempre ilumina mi camino y guía mis pasos: mis padres. No son suficientes las palabras y nunca podré, por mucho que viva, daros ni expresar mi profunda gratitud y amor hacia vosotros por todo lo que me habéis dado en toda mi vida en general, y en esta etapa de mi vida en particular. Os quiero mucho.

A ti, Anass, gracias por estar siempre a mi lado, desde el primer día que te conocí, animándome y ofreciéndome tu constante apoyo y tus valiosas ayudas.

Agradezco todos los momentos en los que me sentí débil porque me prepararon para ser hoy más fuerte que ayer.

En definitiva, doy las gracias a todos los que me rodean, a los que me apoyan y a los que con una sonrisa me dicen 'tu puedes', porque sin todos vosotros, esto no hubiera sido posible.

## **A mi familia**

*Aprovecha cinco cosas antes de otras cinco cosas:*

*Tu juventud antes de que envejecas,*

*Tu salud antes de que enfermes,*

*Tu riqueza antes de que caigas en la pobreza,*

*Tu tiempo libre antes de que estés ocupado,*

*Y tu vida antes de que mueras.*

*(El profeta Muhammad ﷺ)*





# ÍNDICE

## PORTADA

## AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE 1

ABREVIATURAS 9

RESUMEN ..... 13

## CAPÍTULO I: SÍNTESIS DE DITERPENOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS:

### CASSANOS Y ANÁLOGOS

ANTECEDENTES ..... 23

1. Diterpenos ..... 24

1.1. Generalidades: ..... 24

1.2. Actividad farmacológica ..... 24

1.3. Diterpenos tipo cassano ..... 26

1.3.1. Aislamiento, estructura y actividad biológica ..... 26

1.3.2. Síntesis de diterpenos tipo cassano con anillo C no aromático ..... 32

1.3.3. Síntesis de diterpenos tipo cassano con anillo C aromático ..... 35

1.3.4. Síntesis de taepeninas ..... 36

1.3.5. Aproximaciones Síntéticas hacia análogos de cassanos ..... 38

OBJETIVOS ..... 43

RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 45

1. Síntesis de la taepenina F (17) a partir de (-)- ácido abietico (50) ..... 46

1.1. Aplicación de los resultados obtenidos a la síntesis de la taepenina F (17) ..... 51

2. Síntesis del (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (16) a partir de (+)- esclareolida (99) ..... 54

2.1. Síntesis de los fenoles 104 y 105 ..... 55

2.2. Aplicación del fenol (104) a la síntesis de diterpeno natural de tipo furanocassano (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (16) ..... 59

3. Síntesis de los 14-desmetil análogos de cassanos a partir del ácido dehidroabietico (50) ..... 63

3.1. Justificación ..... 63

3.2. Síntesis de ferruginol (116) a partir del ácido dehidroabiético (51) ..... 64

3.3. Formación del anillo lactol/lactónico del 14-desmetil análogos de cassanos ..... 65

4. Síntesis de análogos bi/tricíclicos de cassanos a partir de  $\beta$ -ciclocitral (124) ..... 68

4.1. Justificación ..... 68

4.2. Preparación del (S) -2,6-dimetilciclohex-1-eno-1-carbaldehído.....	70
4.3. Estudio de la reacción de Diels-Alder.....	70
4.4. Oxidación del aducto 126.....	72
4.5. Transposición del grupo metilo angular de la dienona 128.....	72
4.6. Elaboración del anillo $\gamma$ -lactónico de los análogos bi/tricíclicos de cassanos.....	74
<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>77</b>
1. Introducción .....	78
1.1. Instrumentación.....	78
1.2. Cromatografía.....	79
1.3. Disolventes.....	79
2. Procedimientos experimentales hacia la síntesis la Taepenina F (17) a partir del (-)-abietico (50).....	80
2.1. Dihidroxilación del ácido (-)-abietico (50).....	80
2.2. Esterificación del ácido 136.....	81
2.3. Oxidación del alcohol alílico 81 con el sistema PhSeSePh / <i>t</i> -BuOOH.....	82
2.4. Deshidratación del alcohol 87.....	83
2.5. Reacción de la dienona 88 con el Meli.....	84
2.6. Oxidación del dienol 89.....	85
2.7. Síntesis del fenol 94.....	87
2.8. Protección del fenol 94.....	88
2.9. Desisopropilación del O-metilo 95.....	89
2.10. Preparación del hidroxilaldehído 97.....	90
2.11. Reducción del aldehído 97.....	91
2.12. Síntesis de taepenina F (17).....	92
3. Procedimientos experimentales hacia la síntesis del (5 $\alpha$ )-vouacapane-8(14),9(11)-diene (5). .....	93
3.1. Reacción de cicloadición de Diels Alder sobre el dieno 100.....	93
3.1.1. Síntesis del derivado ftalato 101.....	93
3.1.2. Síntesis del cicloadducto 102.....	94
3.2. Síntesis de la dienona 103.....	95
3.2.1. Tratamiento del cicloadducto 102 con PDC y hidroperóxido de ter-butílico en benceno.....	95
3.2.2. Tratamiento del cicloadducto 102 con el sistema PDC/hidroperóxido de terc-butílico.....	95
3.3. Estudio del reordenamiento dienona-Fenol.....	96
3.3.1. Síntesis del hydroxymonoéster 104.....	97
3.3.1.1. Tratamiento de la dienona 103 con BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub> .....	97
3.3.1.2. Tratamiento de la dienona 103 con AlCl <sub>3</sub> .....	97

3.3.1.3. Tratamiento de la dienona 103 con $\text{AlBr}_3$ .....	98
3.3.2. Síntesis del hydroxydi-éster 105 .....	99
<b>3.4. Síntesis del diol 106</b> .....	<b>100</b>
3.4.1. Tratamiento del fenol 104 con $\text{NaBH}_4$ .....	100
3.4.2. Tratamiento del fenol 104 con $\text{LiAlH}_4$ .....	101
<b>3.5. Síntesis de la lactona 107</b> .....	<b>102</b>
<b>3.6. Reducción de la lactona: Síntesis del lactol 108</b> .....	<b>103</b>
<b>3.7. Deshidratación del lactol 81: Síntesis del (5<math>\alpha</math>)-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (16)</b> .....	<b>105</b>
<b>3.8. Síntesis del hidroxialdehído 110</b> .....	<b>106</b>
<b>4. Procedimientos experimentales hacia la síntesis del análogo 14-desmetil (5<math>\alpha</math>)-vouacapane-8(14),9(11)-diene (16) a partir del ácido deshidroabiético (51)</b> .....	<b>107</b>
4.1. Protección del ferruginol (116) .....	107
4.2. Tratamiento del 12-metoxiderivado 117 con diclorometilmetil éter y $\text{AlCl}_3$ .....	108
4.3. Síntesis del 14-desmetil hidroxifenol 119. ....	109
4.4. Síntesis del 14-desmetil diol 120. ....	110
4.5. Carbonización catalizada del 14-desmetil diol 120 .....	111
4.6. Síntesis del 14-desmetil lactol 122 .....	112
<b>5. Procedimientos experimentales hacia análogos bi/tricíclicos de cassanos</b> .....	<b>113</b>
5.1. Preparación del (S) -2,6-dimetilciclohex-1-eno-1-carbaldehído 125 .....	113
5.2. Estudio de la reacción de Diels-Alder del dieno 125 con DMAD .....	114
5.2.1. A reflujo en tolueno .....	114
5.2.2. A reflujo en xileno .....	114
5.2.3. A 130°C sin disolvente .....	115
5.3. Oxidación del cicloadducto 126 .....	115
5.4. Transformación de la dienona 128 en el fenol 102 .....	116
5.5. Tratamiento de la dienona 128 con $\text{I}_2/\text{PPh}_3$ .....	117
5.6. Reducción del grupo éster del fenol 129 mediante $\text{LiAlH}_4$ .....	118
5.7. Lactonización del diol 131: Obtención del análogo tricíclico de la taepenina F (17) .....	119

## **CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>123</b>
1. Generalidades sobre el cáncer .....	124
1.1. ¿Qué es el cáncer? .....	124
1.2. Incidencia y clasificación .....	125

<b>1.3. Cáncer colorrectal.....</b>	<b>128</b>
1.3.1.Epitelio Intestinal .....	128
1.3.2.Factores de riesgo del CCR.....	129
1.3.3.Clasificación del CCR:.....	130
1.3.4.Terapia del CCR.....	132
<b>1.4. Cáncer del hígado .....</b>	<b>132</b>
1.4.1.El hígado.....	132
1.4.2.Factores de riesgo del cáncer de hígado.....	134
1.4.3.Clasificación del cáncer de hígado.....	135
1.4.4.Terapia del cáncer de hígado:.....	136
<b>1.5. Cáncer de piel.....</b>	<b>137</b>
1.5.1.La piel.....	137
1.5.2.Epidermis .....	137
1.5.3.Factores de riesgo del cáncer de piel.....	138
1.5.4.Clasificación del cáncer de piel.....	139
1.5.5.Terapia del cáncer de piel.....	141
<b>2. Fisiología alterada por el cáncer .....</b>	<b>141</b>
<b>2.1. Ciclo celular .....</b>	<b>141</b>
<b>2.2. Apoptosis.....</b>	<b>144</b>
2.2.1.Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis.....	144
2.2.2.Características morfológicas.....	146
2.2.3.Mecanismos de inducción de apoptosis .....	147
<b>3. Generalidades sobre la respuesta inmunitaria.....</b>	<b>152</b>
<b>3.1. Sistema inmune .....</b>	<b>153</b>
3.1.1.Inmunidad innata y adaptativa.....	153
3.1.2.Células del sistema inmune .....	154
3.1.3.Mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata .....	156
3.1.4.Fases de la reacción inflamatoria.....	157
3.1.5.Proceso molecular involucrado en la respuesta inflamatoria : Mediadores de la inflamación .....	158
3.1.6.Macrófagos.....	164
3.1.7.Tipos de Inflamación y enfermedades crónicas .....	166
3.1.8.Terapia antiinflamatoria.....	167
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>168</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>172</b>

<b>1. Preparación de la muestra</b> .....	173
<b>2. Técnicas de cultivo celular</b> .....	174
<b>2.1. Líneas celulares</b> .....	174
2.1.1.Línea tumoral HT29.....	174
2.1.2.Línea tumoral B16-F10.....	176
2.1.3.Línea tumoral HepG2.....	177
2.1.4.Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7.....	178
<b>2.2. Subcultivos celulares: preparación del medio de cultivo y mantenimiento</b> .....	180
2.2.1.Conservación de las líneas celulares.....	181
2.2.2.Descongelación de las líneas celulares.....	181
<b>3. Métodos para la determinación de las propiedades biológicas</b> .....	181
<b>3.1. Contaje celular y Comprobación De Viabilidad</b> .....	181
<b>3.2. Determinación de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT</b> .....	182
3.2.1.Fundamento del ensayo MTT.....	182
3.2.2.Protocolo del ensayo MTT.....	183
<b>3.3. Determinación de la actividad antitumoral mediante citometría de flujo</b> .....	185
3.3.1.Estudio del ciclo celular.....	186
A) Fundamento.....	186
B) Técnica.....	187
3.3.2.Estudio de la apoptosis.....	188
A) Fundamento.....	188
B) Técnica.....	190
3.3.3.Estudio del cambio de potencial de la membrana mitocondrial.....	191
A) Fundamento.....	191
B) Técnica.....	192
<b>3.4. Determinación de la actividad antiinflamatoria</b> .....	193
3.4.1.Determinación de la producción del óxido nítrico en los macrófagos murinos RAW 264.7.....	193
A) Fundamento.....	193
B) Técnica.....	195
<b>3.5. Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante citometría de flujo: Estudio del ciclo celular</b> .....	195
<b>4. Análisis estadístico de los resultados</b> .....	196
<b>RESULTS</b> .....	198
<b>1. Anti-cancer activities</b> .....	199

<b>1.1. Cancer cell proliferation assay</b> .....	199
1.1.1.Cytotoxicity of group I compounds: .....	200
1.1.2.Cytotoxicity of group II compounds: .....	201
1.1.3.Cytotoxicity of group III compounds: .....	204
1.1.4.Cytotoxicity of group IV compounds: .....	207
<b>1.2. Cell cycle Arrest and Distribution</b> .....	211
<b>1.3. Characterization of apoptotic effects by flow cytometry with annexin-V</b> .....	214
<b>1.4. Mitochondrial membrane potential disturbances</b> .....	217
<b>2. Antiinflammatory activity</b> .....	219
2.1. Cytotoxicity on RAW 264.7 cell line .....	219
2.2. Inhibition of NO production.....	223
2.3. Cell cycle Arrest and Distribution .....	230
<b>DISCUSSION</b> .....	236
<b>ANTICANCER ACTIVITIES</b> .....	238
1. Induced cytotoxicity of Cassane-type diterpenoids and analogues on cancer cell lines.....	238
2. Dienone 91 and Hydroxyaldehyde 97 induced cell cycle arrest in B16F10 cell line .....	246
3. Dienone 91 and Hydroxyaldehyde 97 induced apoptosis in B16F10 cell line.....	249
4. Dienone 91 and hydroxyaldehyde 97 effects on mitochondrial membrane potential.....	252
<b>ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES</b> .....	255
1. Induced cytotoxicity of Cassane-type diterpenoids and analogues on in RAW 264.7 monocyte/ macrophage murine cells .....	256
2. Cassane-type diterpenoids (1st and 2nd group) inhibited Nitric Oxide production .....	258
3. Dienone 91 and Hydroxyaldehyde 97 reverted the RAW624.7 cell cycle arrest induced by LPS.....	265
<b>CONCLUSIONES</b> .....	270
<b>ESPECTROS</b> .....	274





# ABREVIATURAS

Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AMCPB	Ácido meta-cloroperbenzoico.
APTS	Ácido para-toluensulfónico.
[α]D	Poder rotatorio
BAS	Enzima β-amirina
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína asociada al linfoma de células-B de tipo 2
Bi (OTf) <sub>3</sub>	Bismuth(III) trifluoromethanesulfonato
Boc	Grupo protector terc-butiloxicarbonilo
Boc <sub>2</sub> O	Dicarbonato de di-terc-butilo
B16F10	Línea celular de melanoma
Caspasa	Cisteinil aspartato proteasa
CCF	Cromatografía en capa fina.
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
Conc.	Concentrado.
COX-2	Ciclooxigenasa 2
δ	desplazamiento químico
DCM	Diclorometano
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona.
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHA	Ácido dehidroabiético.
DHR	Dihidrorodamina
DMAD	acetileno dicarboxilato de dimetilo
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMAPP	Pirofosfato de 2-isopentenilo o pirofosfato de Dimetilalilo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMP	Dess-Martin periodinano.

DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Et <sub>2</sub> O	Dietil éter
EtOAc	Acetato de etilo
FCS	Fetal Calf Serum (suero bovino fetal)
GGPP	geranilgeranilpirofosfato
h	Hora.
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución.
HepG2	Línea celular de hepatocarcinoma
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
<sup>1</sup> H RMN	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones
HT29	Línea celular de adenocarcinoma de colon humano
IBX	ácido 2-iodobenzoico
IC <sub>50</sub>	Concentración que inhibe la proliferación celular al 50%, del inglés “inhibitory concentration 50”
IC <sub>80</sub>	Concentración que inhibe la proliferación celular al 80%
IL-6	Interleuquina-6
IP	Ioduro de propidio
IPP	Pirofosfato de 3-isopentenilo o pirofosfato de isopentenilo
IR	Espectro de infrarrojo
LPS	Lipopolisacárido
Me	Metilo
MeOH	Metanol
min	Minuto
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
m/z	Relación masa/carga
nm	Nanómetros
NAC	N-acetil cisteína
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NBS	N-Bromosuccinimida
NF-KB	Factor nuclear de las cadenas Kappa, células B activadas

NO	Óxido Nítrico
NOE	Efecto nuclear overhauser.
p.f.	punto de fusión
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés “phosphate-buffered saline”
PDC	Dicromato de piridinio.
Ph	Fenilo.
P(o-tol) <sub>3</sub>	Tri-(o-tolil)fosfina
p.p.m.	Partes por millón.
p24	Proteína de la cápside del VIH
P450	Complejo enzimático de monooxigenasas
PBS	Phosphate buffert saline
Rpms	Revoluciones por minuto
rt	Temperature ambiente
Rh	Rodamina
SAR	Relación estructura-actividad del inglés <i>Structure -Activity Relationship</i>
Sat.	Saturado.
RAW264.7	Línea celular de Macrófagos murinos
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés “reactive oxygen species”
T.a	Temperatura ambiente.
TBS	Tris-buffered saline
t-BuOH	Terc-Butanol.
t-BuOK	Terc-Butóxido de potasio.
Tf	Trifluorometanosulfonato.
TFA	Ácido trifluoroacético.
TfOH	ácido trifluorometansulfónico
THF	Tetrahidrofurano.
TRAILR	Receptor implicado en la inducción de la apoptosis
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral tipo alfa
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral

# RESUMEN

El hombre, desde sus comienzos, ha utilizado las virtudes de la naturaleza para su beneficio. En ella existe una enorme diversidad de organismos vivos que biosintetizan todo tipo de sustancias químicas durante su metabolismo, siendo el reino vegetal una amplia fuente de nuevos agentes terapéuticos que han ayudado a mejorar la salud y el bienestar del ser humano.

Estos compuestos pueden tener funciones esenciales para la vida, como es el caso de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, llamados **metabolitos primarios**. Otros, en cambio, no son esenciales para la vida, pero cumplen importantes funciones de supervivencia: son los denominados **metabolitos secundarios**. Estos participan en mecanismos adaptativos de defensa, comunicación y autoconservación, entre otros y normalmente se generan en pequeñas cantidades, pero sus funciones son vitales para la supervivencia de los seres vivos. Los metabolitos secundarios pueden ser clasificados según su origen biosintético, en alcaloides, policétidos, terpenoides...etc. Entre ellos, los terpenoides, pertenecen a la amplia familia de isoprenoides (se construyen a partir de unidades de cinco carbonos denominados isopreno). Normalmente procedentes del ácido mevalónico, destacan por su abundancia en la naturaleza y su nutrida variedad de estructuras aisladas tanto de especies vegetales (sintetizan más de 22000 derivados isoprénicos 3) como de especies animales, insectos o microorganismos. Los diterpenos, que constituyen un extenso grupo de terpenoides ampliamente distribuidos en el reino vegetal y en diversos microorganismos, forman parte de estos metabolitos bioactivos. Sus espectros de actividades biológicas, variados y potentes en muchos casos, suponen un estímulo tanto para la investigación académica como para sectores industriales como el farmacéutico, agroalimentario, cosmético o incluso el de perfumería.

Sin embargo, y a pesar de su interés netamente demostrado, la difícil obtención de estos metabolitos y su escasa proporción en sus fuentes naturales, supone una limitación considerable, no sólo para llevar a cabo estudios detallados de sus propiedades biológicas, sino también para conseguir aplicaciones industriales capaces de rentabilizar el potencial de estos metabolitos. Ello, junto al continuo aislamiento de nuevas estructuras, supone un desafío para muchos investigadores del campo: el llevar a cabo procesos de síntesis orgánica o metodologías que permiten la obtención de cantidades suficientes de estos productos con el fin de profundizar en los estudios aplicados, y así, conseguir evaluar el potencial verdadero de estos metabolitos en sectores industriales como es el sector farmacéutico.

Una de las líneas principales de investigación de nuestro grupo “Productos Naturales y Síntesis Orgánica Aplicada”, consiste en el desarrollo de nuevas rutas sintéticas y metodologías para la

síntesis de terpenos y compuestos relacionados de alto valor añadido a partir de compuestos naturales mucho más asequibles y económicamente rentables, e incluso comerciales. En paralelo, nuestro grupo posee otra línea de investigación, basada en la preparación de derivados de los productos naturales con objeto de realizar un screening biológico en búsqueda de potenciales aplicaciones.

Dentro de este contexto se enmarca la presente tesis doctoral, Investigación y desarrollo de nuevas rutas sintéticas hacia diterpenos naturales: Furanocassanos aromáticos, a partir de compuestos naturales más abundantes y comerciales más económicos como el ácido (-)-abiético (**50**) y (+)-esclareolida (**99**). Paralelamente, se describen las síntesis de análogos monoterpénicos relacionados estructuralmente con estos diterpenos de tipo cassano, a partir de  $\beta$ -ciclocitral (**124**), con el objeto de estudiar la relación estructura-actividad (*SAR*) de estas sustancias naturales. Finalmente se llevará a cabo la investigación del potencial biológico de los compuestos importantes obtenidos, mediante ensayos de actividad anticancerígena y antiinflamatoria.

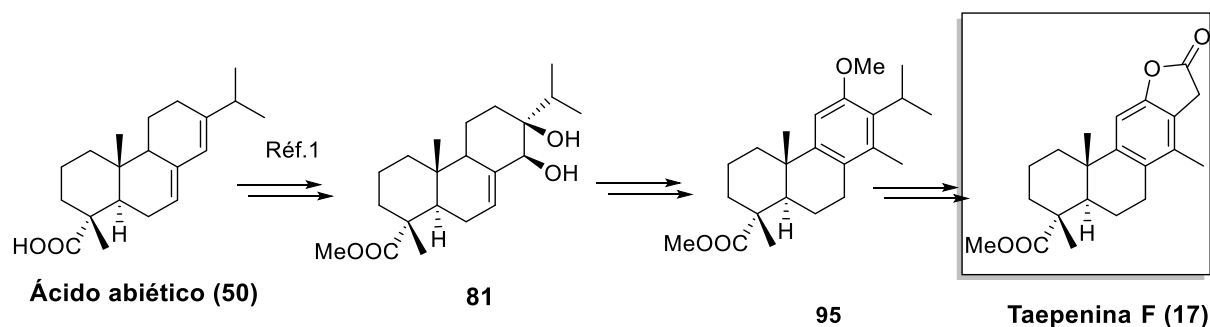
Esta memoria se ha estructurado en dos capítulos:

- El primer capítulo está dedicado a la síntesis de productos naturales y compuestos relacionados con un potencial farmacéutico. Este capítulo se compone de cuatro partes:

En la primera parte se expone una nueva estrategia de síntesis de diterpenos tipo casano con anillo lactónico, taepeenina F (**17**). Las taepeeninas son características de la leguminosa *Caesalpinia crista*, procedentes principalmente del sudeste asiático. El potencial bioactivo de esta familia de compuestos no ha sido estudiado en profundidad, pero algunos de ellos ya muestran resultados prometedores.

Para ello elegimos el ácido (-)-abiético (**50**) como material de partida, es el compuesto más abundante de los ácidos presentes en las resinas de diferentes especies de pineáceas, es un recurso natural muy abundante y económico, su estructura posee una función de ácido carboxílico (C-18) sobre C-4, además la presencia del sistema diénico en los anillos B y C en los carbonos C-7 y C-8 y C-13 y C-14 permite la funcionalización de estos anillos, lo que facilitará la obtención del esqueleto cassano y particularmente la síntesis de la taepeenina F(**17**).





**Esquema 1.** Síntesis de taepenina F (**17**) a partir del (-)- ácido abiético (**50**).

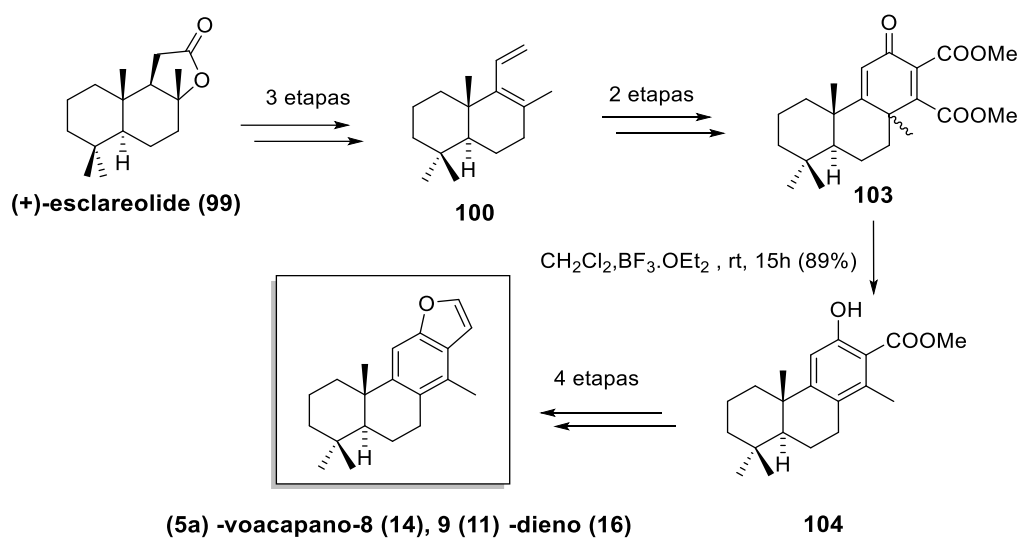
En primer lugar, la introducción del grupo metilo en el C-14, característico de los cassanos, a través de precursores fácilmente elaborables a partir del ácido abiético (**50**).<sup>1</sup> En segundo lugar, se realizó la reacción de desisopropilación de derivados abietato de metilo **95**, como paso clave en la obtención del esqueleto de las taepeninas. Finalmente, se estudiará la formación del anillo lactónico para alcanzar la síntesis de la taepenina F (**17**).

En la segunda parte, se describe la síntesis del diterpeno tipo cassano con anillo furánico (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**), a partir de (+)-esclareolida (**99**). El uso de producto de partida con configuraciones absolutas conocidas, permitirá establecer con certeza la estereoquímica de los compuestos obtenidos y, por tanto, de los naturales.

El desarrollo del proceso sintético, se llevará a cabo sin uso de grupos protectores, y con la máxima economía de átomos además, incluye una etapa sin uso de disolvente, lo cual permite considerarse como procesos que contribuyen en parte a la química sostenible. El proceso llevado a cabo parte del dieno terpénico **100**, preparado en sólo tres etapas a partir de (+)-esclareolida (**99**), la reacción de cicloadición de Diels-Alder de este dieno en condiciones específicas, seguida de una oxidación con PDC conduce a la dienona **103**, clave para la obtención del compuesto objetivo: (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**), un furanoditerpeno de tipo cassano que puede ser usado como marcador químico para diferenciar entre dos especies de *Caesalpinia* (*C. crista* y *C. bonduc*)<sup>2</sup>. (Esquema 2)

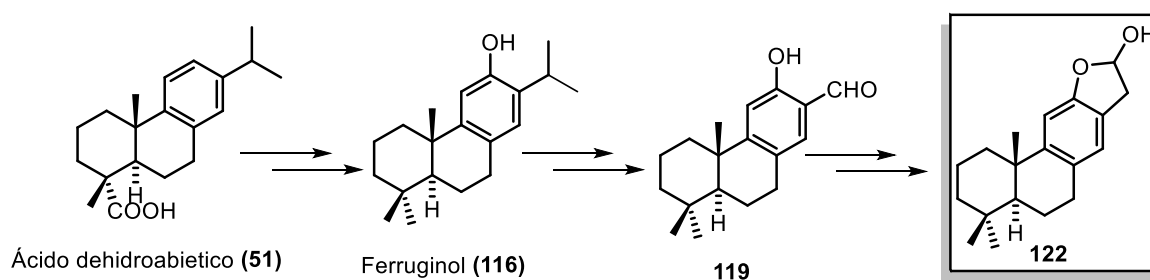
<sup>1</sup> Alvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Bentaleb F, Alvarez E, Escobar MA, Sad-Diki S, Cano MJ, Messouri I. Regioselective routes towards 14-hydroxyabietane diterpenes. A formal synthesis of immunosuppressant (-)-triptolide from (+)-abietic acid. *Tetrahedron*. 2007;63(45):11204–12.

<sup>2</sup> J Jadhav AN, Kaur N, Bhutani KK. A new furanoditerpenoid marker for the distinction between the seeds of two species of *Caesalpinia*. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2003 Sep;14(5):315-8.



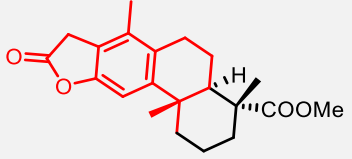
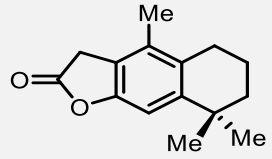
**Esquema 2.** Síntesis del (5α)-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (16), a partir de (+)-esclareolida (99).

En la tercera parte, se plantea la síntesis de 14-desmetil análogos de diterpenos de tipo cassano con anillo C aromático. La síntesis de los 14-desmetil análogos se aborda en dos partes; En la primera, se lleva a cabo la síntesis del ferruginol (116) a partir del ácido deshidroabiético (51) siguiendo un procedimiento elaborado anteriormente por nuestro grupo y en la segunda parte, se elabora el anillo furánico / lactónico de los 14 -desmetil análogos de cassanos siguiendo el mismo proceso que se aborda en la segunda parte de esta tesis.



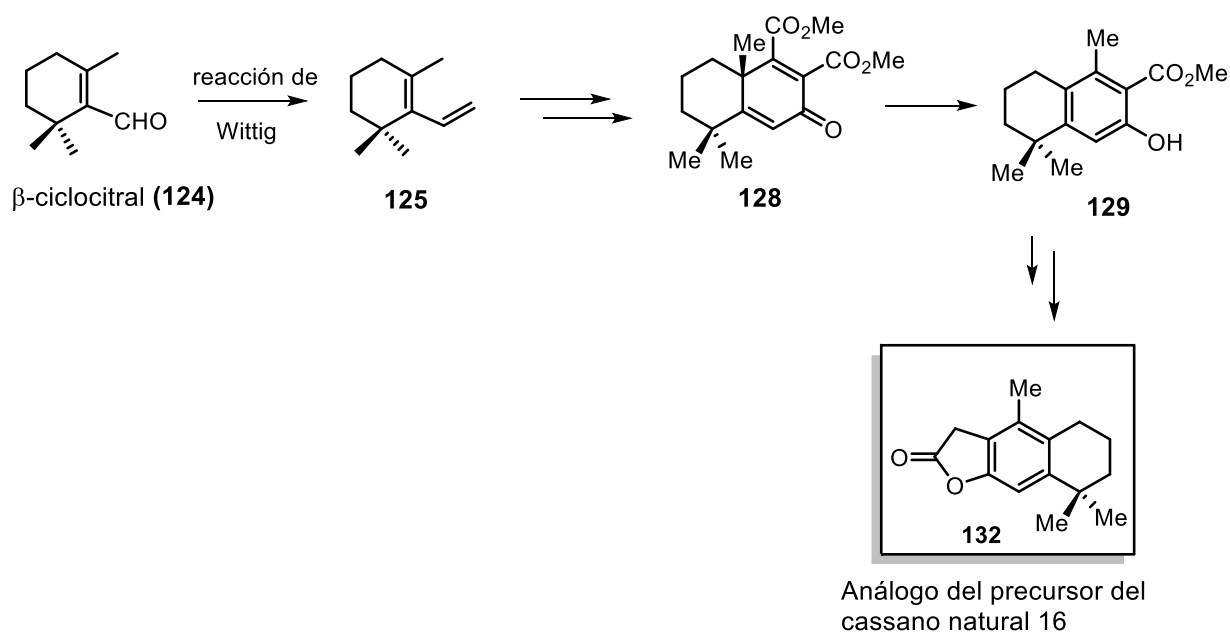
**Esquema 3.** Síntesis de los 14-desmetil análogos de casanos a partir del ácido desidroabiético (51)

En la cuarta parte de este capítulo, se plantea investigar la obtención de análogos monoterpénicos de cassanos (Esquema 4) a partir de  $\beta$ -ciclocitral (**124**), con objeto de obtener fácilmente moléculas potencialmente activas.

Diterpeno tipo Cassano lactónico	Análogo tricíclico del cassano lactónico
 <p>Taepenina F (<b>17</b>)</p>	 <p><b>132</b></p>

**Esquema 4.** Análogos tricíclicos del esqueleto cassano

Para ello, se sigue la misma estrategia de síntesis del (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**), tal como se recoge en el esquema 4.



**Esquema 5.** Síntesis análogos tricíclicos de casanos a partir de  $\beta$ -ciclocitral (**124**)

- El segundo capítulo está consagrado a la investigación de la actividad biológica de los productos finales y algunos intermediarios sintéticos sintetizados en el primer capítulo: se abordó el estudio de la actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colon (HT-29), de melanoma piel (B16F10) y de hepatocarcinoma (HepGe-2), y la actividad antiinflamatoria en la línea celular de macrófagos murinos (RAW-264.7). Se investigó también el potencial farmacéutico de los análogos bicíclicos y tricíclicos de cassanos y el papel del grupo metilo en C14 del esqueleto cassano, en estas actividades biológicas. Catorce de los compuestos ensayados mostraron una potente actividad, en particular los derivados **91**, **97**, **108**, **110** y el análogo tricíclico **131**.

Paralelamente, se estudiaron mediante citometría de flujo, los efectos sobre la distribución del ciclo celular en la línea B16F10, causados por los compuestos **91** y **97**, dada sus importantes actividades citotóxicas: los resultados mostraron que los dos compuestos exhibieron una detención del ciclo celular mediante el bloqueo de la fase G0/G1 con un porcentaje llegando al 76.36% respecto a la dienona **97** y 70.55% para el aldehído salicílico **91**, bajo concentración de IC<sub>80</sub>, tras 72 horas de tratamiento. Esta detención del ciclo celular refleja una inducción de la apoptosis, mediante un aumento de la población celular apoptótica, alcanzando el 46 % en el caso de la dienona **91** frente a 38.4% para al aldehído **97**. En una aproximación al mecanismo molecular, se ha mostrado que la dienona **91** activa la vía apoptótica extrínseca bajo las concentraciones IC<sub>50</sub> y IC<sub>80</sub>, al igual que el aldehído **97** a las IC<sub>50</sub>, sin embargo a la concentración de IC<sub>80</sub>, este compuesto induce la activación secundaria de la vía intrínseca como evento final en el mecanismo apoptótico extrínseco.

De otra parte se desarrolló también la actividad antiinflamatoria de algunos de los compuestos sintetizados, mediante el ensayo de Griees (la inhibición de la producción de los nitritos) en los macrófagos murinos RAW264.7, activados por LPS, la mayoría de los productos exhibieron un importante potencial antiinflamatorio, llegando hasta el 100 % de la inhibición de la liberación del Óxido Nítrico bajo concentraciones sub-citotóxicas ( $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> y  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub>) a las 72 horas



CAPÍTULO I.  
SÍNTESIS DE DITERPENOS  
BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS:  
CASSANOS Y ANÁLOGOS



# ANTECEDENTES



## 1. Diterpenos

### 1.1. Generalidades:

Los diterpenos son otra gran familia de terpenoides que, según las circunstancias, pueden aparecer en plantas y animales junto con los monoterpenos (C-10) y sesquiterpenos (C-15). Se trata de compuestos con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno, C- 20), por lo que su peso molecular es superior al de monoterpenos y sesquiterpenos, y su volatilidad es menor.

La mayoría de los diterpenos han sido extraídos de plantas vasculares, y de algunos talofitas, principalmente algas y hongos. Pueden actuar, en algunos casos, como sustancias repelentes, también como feromonas atrayentes de insectos e incluso como compuestos citotóxicos frente a células tumorales<sup>3</sup>

Los diterpenos son compuestos caracterizados por poseer una estructura básica de 20 carbonos y proceder del precursor 2E, 6E, 10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), presentando una gran variabilidad estructural. En una primera instancia, los diterpenos pueden dividirse en dos grandes grupos, compuestos acíclicos y compuestos ciclados<sup>4</sup>. Los compuestos acíclicos son los menos frecuentes, pudiendo ser lineales o poseer un ciclo lactónico o éter. Por su parte, los diterpenos cíclicos son clasificados a su vez en: bicíclicos (labdanos y clerodanos), tricíclicos (pimaranos, isopimaranos, abietanos, casanos y rosanos), tetracíclicos (kauranos, atisiranos, beyeranos y giberelinas) y pentacíclicos (traquilobanos).

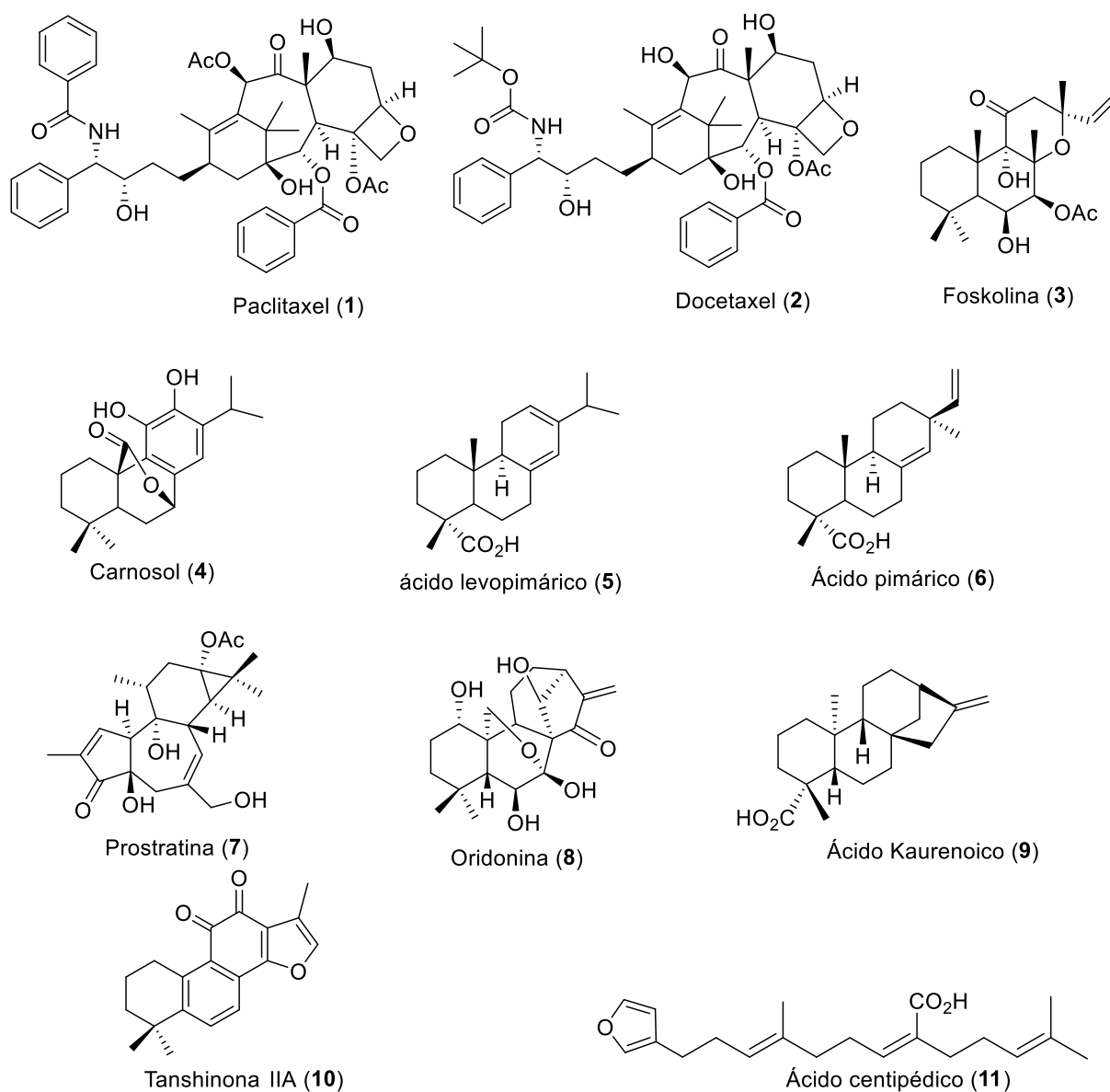
### 1.2. Actividad farmacológica

El interés farmacológico de los diterpenos está fuera de toda duda, si recordamos que dentro de este grupo se encuentran los diterpenos tricíclicos del género *Taxus* y sus derivados (**paclitaxel** o Taxol® (1) y **docetaxel** o Taxotere® (2)), utilizados actualmente en la terapia de algunos tipos de cáncer por su acción antimetabólica. Además de estos compuestos, existen otros diterpenos que presentan interesantes actividades farmacológicas que los convierten en potenciales agentes terapéuticos. Así, podemos mencionar las propiedades antihipertensivas de la **forskolina** (3), la antiagregante plaquetaria del **carosol** (4) y de los ácidos **pimárico** (5) y

<sup>3</sup> a) Orter, J. W. & Spurgeon SL. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Wiley 1981, editor. New York.: WileyInterscience Publication.; 1981. Vol.I. b) chiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, et al. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): Patters of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol*. 2000;186(6):567-74. c) Iguchi K, Sawai H, Nishimura H, Fujita M, Yamori T. New dolabellane-type diterpenoids from the Okinawan soft coral of the genus *Clavularia*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 2002 Jan;75(1):131-6.

<sup>4</sup> Bruneton J. *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. 2a edición. Acribia SA, editor. Zaragoza, España; 2001, 1100 p (No. RS 164. B7818 2001).

**levopimárico (6)**<sup>5</sup>. También se han encontrado otras propiedades farmacológicas para estos compuestos, entre las que se destacan las propiedades antirretrovirales de la **prostratina (7)**, antitumorales de la **oridonina (8)**, antiparasitarias del **ácido kaurenoico (9)** frente al *Trypanosoma cruzi*, antiinflamatorias de numerosos diterpenos obtenidos de la familia Lamiaceae como la **tanshinona IIA (10)**, además de las propiedades analgésicas y gastroprotectoras del **ácido centipédico (11)**<sup>6</sup>. Esquema 6.



**Esquema 6.** Diterpenos representativos con diferentes esqueletos y actividades biológicas

<sup>5</sup> Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial. 1991. 594 p.

<sup>6</sup> RAMIREZ M. Contribución al estudio químico de *Conyza trihecatactis* (Blake) Cuatrecasas (COMPOSITAE-ASTERACEA) y sus posibles efectos farmacológicos. Trabajo de grado para optar al título de Bióloga. Universidad Javeriana, Bogotá.; 2008.

### 1.3. Diterpenos tipo cassano

#### 1.3.1. Aislamiento, estructura y actividad biológica

Entre la gran variedad estructural de diterpenos naturales conocidos, merecen ser destacados los furanoditerpenos tipo cassano. Son una familia de metabolitos aislados en la última década a partir de diferentes especies vegetales, en su mayoría pertenecientes al género *Caesalpinia*, de la familia de las Fabaceae, comprendiendo aproximadamente 100 especies que se distribuyen comúnmente en China, Tailandia, Vietnam y otros países de ubicación tropical y subtropical<sup>7</sup>.

Este género, se caracteriza también por la presencia de flavonoides, triterpenoides, esteroides, lignanos, fenilpropanoides, alcaloides.<sup>8</sup>

Al ser los componentes químicos principales y característicos de *Caesalpinia*, los cassanos han sido estudiados ampliamente, por tener un gran potencial como nuevos fármacos dadas sus actividades biológicas (antiinflamatorias, antitumorales, antipalúdicas, antivirales, antioxidantes y antimicrobianas)<sup>9</sup>. Por otra parte, desde 1967, quince especies que contienen cassanos, han sido investigadas vigorosamente como medicinas a base de hierbas, incluyendo: *C. minax*, *C. sappan*, *C. bonduc*, *C. decapetala*, *C. pulcherrima*, *C. volkensii*, *C. echinata*, *C. crista*, *C. spinosa*, *C. mimosoides*, *C. platyloba*, *C. magnifoliolata*, *C. benthamiana*, *C. major* y *C. bonducella*<sup>10</sup>.

Los diterpenos tipo cassano presentan una distribución restringida en varios géneros de la familia *Fabaceae* (especialmente a *Caesalpinia* género), como se ha citado previamente, pero la distribución de diterpenos norcassanos está restringida al género *Caesalpinia* (*C. crista* o *C. bonduc*). De hecho, además de *Caesalpinia*, también se encontraron cassanos en plantas de

<sup>7</sup> a) Sun ZC, Ma GX, Yuan JQ, Wei H, Wu HF, Sun ZH, et al. Two new degradative cassane-type diterpenes isolated from *Caesalpinia minax*. *J Asian Nat Prod Res.* 2014;16(2):187–91. b) Bi D, Xia G, Li Y, Liang X, Zhang L, Wang L. Two new cassane diterpene lactams from the fruits of *Caesalpinia mimosoides* Lam. *Nat Prod Res.* 2018;32(8):875–9. c) Zhang JY, Wu FH, Qu W, Liang JY. Two new cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. *Chin J Nat Med.* 2012;10(3):218–21.

<sup>8</sup> a) Baldim Zanin JL, De Carvalho BA, Martineli PS, Dos Santos MH, Lago JHG, Sartorelli P, et al. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): *Phytochemical and pharmacological characteristics Molecules.* 2012;17(7):7887–902. b) Ming Wu, Yu-Fang Wang, Man-Li Zhang, Chang-Hong Huo, Mei Dong, Qing-Wen Shi and HK. Chemical constituents of plants from the genus *Euonymus*. *Chem Biodivers.* 2011;8:1370–99.

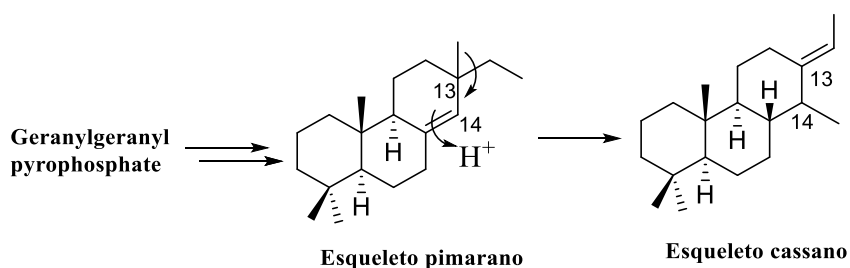
<sup>9</sup> a) Zheng Y, Zhang SW, Xuan LJ. Trinorcassane and cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia minax*. *Fitoterapia.* 2015;102:177–81. b) Maurya R, Ravi M, Singh S, Yadav PP. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia.* 2012;83(2):272–80.

<sup>10</sup> Jing W, Zhang XX, Zhou H, Wang Y, Yang M, Long L, et al. Naturally occurring cassane diterpenoids (CAs) of *Caesalpinia*: A systematic review of its biosynthesis, chemistry and pharmacology. *Fitoterapia.* 2019;134(February):226–49.

*Bowdichia*, *Plathymenia*, *Oryza*, *Erythrophleum*, *Swartzia* y *Laxiflorus*, así como en algunos microorganismos de *Paraconiotlyrium*<sup>11</sup>, <sup>9b</sup>.

El esqueleto básico de los diterpenos tipo cassano, se caracteriza por una estructura tricíclica, con un grupo etilo en C-13 y otro metilo en C-14. En cambio, los *norcasanos* tienen un carbono menos del esqueleto cassano desde las posiciones C-17 o C-16.

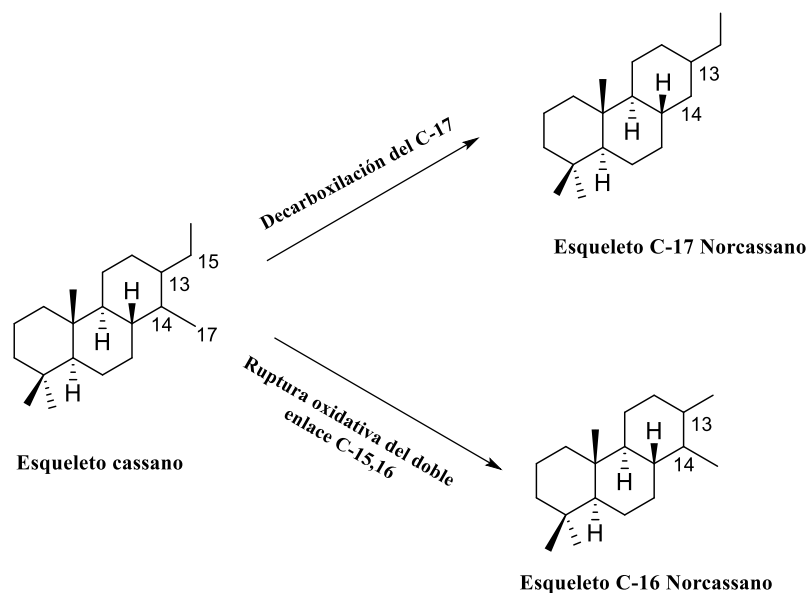
Se considera que el esqueleto cassano deriva de un precursor pimaránico, mediante migración de un grupo metilo de C-13 a C-14; mientras que el diterpeno 17-*norcasano* puede ser biosintetizado por descarboxilación de diterpenos de tipo cassano y diterpenos de tipo 16-*norcasano*, probablemente derivado de la ruptura oxidativa del doble enlace C-15,<sup>12</sup>



**Esquema 7a.** Ruta biosintética propuesta para los diterpenos tipo cassano.

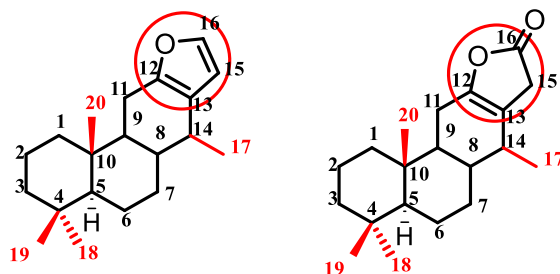
<sup>11</sup> Bao H, Zhang Q, Ye Y, Lin L. Naturally occurring furanoditerpenoids: distribution, chemistry and their pharmacological activities. Vol. 16, *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands; 2017. 235–270 p.

<sup>12</sup> a) Banskota AH, Attamimi F, Usia T, Linn TZ, Tezuka Y, Kalauni SK, et al. Novel norcassane-type diterpene from the seed kernels of *Caesalpinia crista*. *Tetrahedron Lett.* 2003;44(36):6879–82. b) Overtone KH. K.H. Overtone, Terpenoids and steroids, vol. 4. Vol. 4., *Chemical Society*. 1974.



**Esquema 7b** . Ruta biosintética propuesta para los diterpenos tipo norcassano.

Existen numerosos compuestos con estructuras diterpénicas de tipo cassano aislados de la especie *Caesalpinia*: compuestos tricíclicos, tetracíclicos con un anillo furánico fusionado o tetracíclicos con un anillo de butenolida, diterpenoides de tipo *nor*-cassano, entre otros:

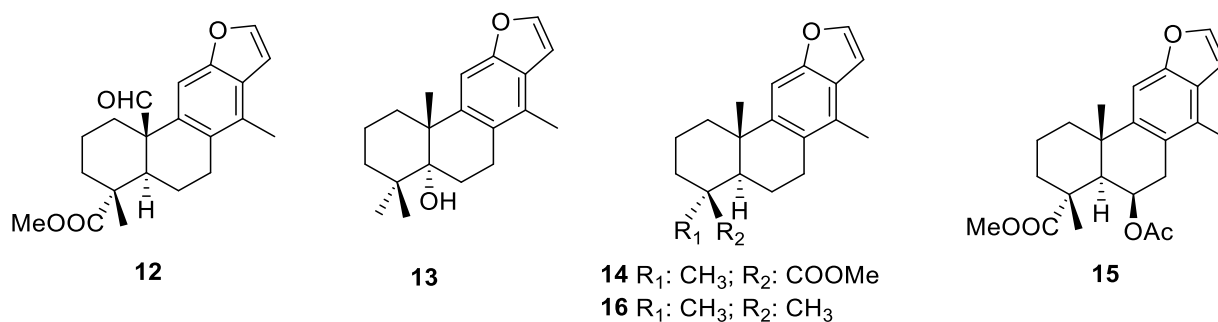


**Esquema 8**. Estructura general de diterpenos tipo cassano tetracíclicos con anillo furano y lactona butenolida

A) *Diterpenoides tetracíclicos de tipo cassano con un anillo de furano fusionado (Furanoditerpenoides)*

Se caracterizan por un esqueleto compuesto de tres anillos ciclohexánicos, un anillo furánico fusionado en C-12 y C-13, además de la presencia de grupos metilos conectados respectivamente en C-4 (Me-18 y Me-19), C-10 (Me-20) y C-14 (Me-17).

Además, estos compuestos presentan con frecuencia un alto grado de funcionalización. Algunos ejemplos que ilustran esta diversidad estructural (Esquema 8) son: **neocaesalpin AD (12)**, que exhibe actividad moderada contra A549, HepG-2 y HeLa con valores de IC<sub>50</sub> que oscilan entre 53,9 y 83,9 μM<sup>13</sup>. El **hidroxifurano (13)**, un potente inhibidor de óxido nítrico en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS)<sup>14</sup>. El antibacteriano **bentaminina1 (14)** con valores de CMI de 47,8 microM para *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus flavus*.<sup>15</sup> La **taepenina D (15)**, aislada de *C. mimosoides*, muestra una potente actividad inhibidora del NO, con valores de IC<sub>50</sub> de 8,2 μM<sup>16</sup>. El **(5α)-vouacapano-8(14),9(11)-dieno, (16)** denominado también 17-metilvouacapano-8(14)-9(11)-dieno (**16**), aislado de *Caesalpinia Crista*<sup>2, 17</sup>, del que aún no se han reportado ensayos biológicos. Sin embargo, se sabe que la presencia del anillo furánico en la estructura aumenta la actividad biológica de estos compuestos, ya que sus características químicas lo convierten en un buen farmacóforo, debido a la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con residuos proteicos<sup>9b, 11, 18</sup>



<sup>13</sup> Ma GX, Xu XD, Cao L, Yuan JQ, Yang JS, Ma LY. Cassane-type diterpenes from the seeds of caesalpinia minax with their antineoplastic activity. *Planta Med.* 2012;78(12):1363–9.

<sup>14</sup> Lyder DL, Peter SR, Tinto WF, Bissada SM, McLean S, Reynolds WF. Minor cassane diterpenoids of Caesalpinia bonduc. *J Nat Prod.* 1998;61(12):1462–5.

<sup>15</sup> Dickson RA, Houghton PJ, Hylands PJ. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from Caesalpinia benthamiana. *Phytochemistry.* 2007;68(10):1436–41.

<sup>16</sup> a) Cheenpracha S, Srisuwan R, Karalai C, Ponglimanont C, Chantrapromma S, Chantrapromma K, Fun HK, Anjum S. New diterpenoids from stems and roots of Caesalpinia crista. *Tetrahedron.* 2005 Sep 5;61(36):8656–62. b) Rifai Y, Arai MA, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M. Terpenoids and a flavonoid glycoside from Acacia pennata leaves as hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors. *J Nat Prod.* 2010;73(5):995–7.

<sup>17</sup> a) Yadav PP, Maurya R, Sarkar J, Arora A, Kanojiya S, Sinha S, Srivastava MN, Raghubir R. Cassane diterpenes from Caesalpinia bonduc. *Phytochemistry.* 2009 Jan 1;70(2):256–61. b) Udenigwe CC, Ata A, Samarasekera R. Glutathione S-transferase inhibiting chemical constituents of Caesalpinia bonduc. *Chem Pharm Bull.* 2007;55(3):442–5. c) Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Chantrapromma K, Laphookhieo S. Cassane-Type Diterpenes from the Seeds of Caesalpinia crista. *Helvetica chimica acta.* 2006 May;89(5):1062–6.

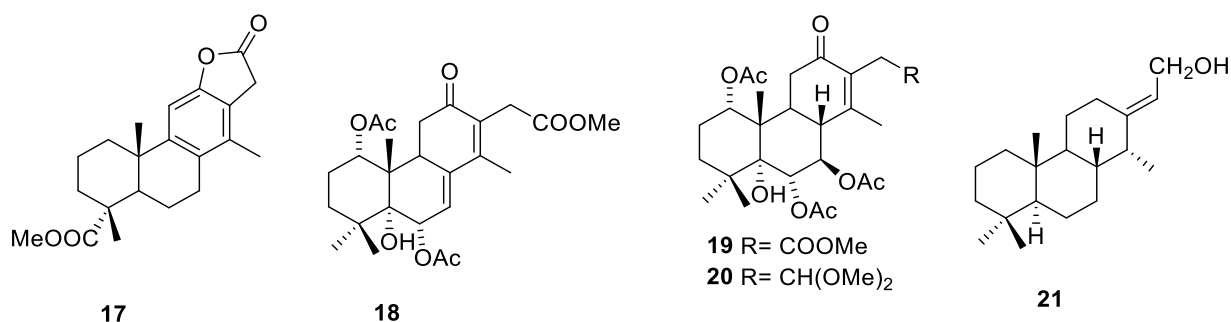
<sup>18</sup> Dickson R, Fleischer T, Houghton P. Cassane-type diterpenoids from the genus Caesalpinia. *Pharmacogn Commun.* 2011;1(1):63–77.

B) *Diterpenoides de tipo cassano tetracíclicos con una lactona butenolida fusionada*

Presentan el mismo esqueleto, sustituciones y oxidaciones que se encuentran en los furanoditerpenoides, excepto la existencia de una lactona butenolida fusionada entre C-12 y C-13 en lugar del anillo furano. Por ejemplo: **taepeenina F (17)** aislada del tallo y raíces de *C. crista*.<sup>16a</sup>; hasta ahora no se han reportado ensayos biológicos de taepeenina F (17).

C) *Diterpenoides de tipo cassano tricíclicos*

Están caracterizados con un esqueleto molecular compuesto de solo tres anillos de ciclohexano sin ningún anillo furánico o lactona fusionado. Además, los sistemas conjugados  $\pi$ - $\pi$ , que incluyen la cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada y 1,3-butadieno, son comunes en la mayoría de ellos. Algunos ejemplos representativos son: la **caesalpina A (18)**, que se examinó a partir de las semillas de *C. minax* y mostró efectos significativos con valores de  $IC_{50}$  de 4,7  $\mu$ M y 2,1  $\mu$ M, respectivamente, en HepG2 y MCF-7, mientras que otro componente **caesalpina C (19)** mostró una actividad inhibidora moderada con valores de  $IC_{50}$  del orden de 10,6  $\mu$ M y 15,6  $\mu$ M. Además, la **caesalpina B (20)** mostró citotoxicidad selectiva contra MCF-7 con valor de  $IC_{50}$  de 7,9  $\mu$ M<sup>19</sup>. Un ejemplo representativo de diterpenoides de tipo cassano tricíclico con fragmento 1,3-butadieno es la **taepeenina L (21)** aislada de la especie *C. mimosoides* que exhibe actividad inhibidora de NO, con una  $IC_{50}$  del orden de 7,1  $\mu$ M.<sup>20</sup>



D) *Diterpenoides de tipo norcasanos*

Poseen un esqueleto básico similar al esqueleto cassano, excepto un carbono menos en las posiciones C-17 o C-16<sup>12b</sup>. Un ejemplo típico de un esqueleto *norcasano* lo representa el **16-**

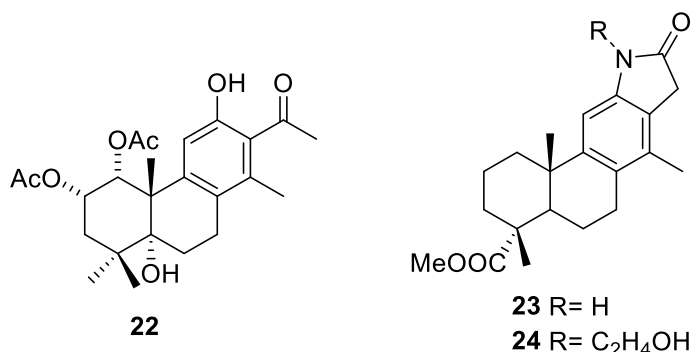
<sup>19</sup> Dickson R, Fleischer T, Houghton P. Cassane-type diterpenoids from the genus *Caesalpinia*. *Pharmacogn Commun.* 2011;1(1):63–77.

<sup>20</sup> Yodsaoue O, Karalai C, Ponglimanont C, Tewtrakul S, Chantapromma S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry*. 2010;71(14–15):1756–64.

**norcaesalpinina C (22)** que se aisló de *C. minax* o *C. crista*, el cual mostró una actividad antipalúdica significativa in vitro contra el clon del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* FCR-3 / A2, con un valor de  $IC_{50}$  de 5,0  $\mu$ M.<sup>21</sup> Otros tipos de diterpenos con esqueleto cassano que fueron aislados en los últimos 10 años, son caracterizados por unas inusuales estructuras de tipo cassano alcaloides y diterpenoides dicassano.

#### E) Diterpenoides de tipo cassano alcaloides

Se caracterizan por un esqueleto diterpénico de tipo cassano con un anillo de lactama en lugar de lactona. Dos ejemplos de estos inusuales cassanos, son **caesmimotams, A y B (23-24)**, que fueron aislados e identificados de *C. mimosoides*.<sup>7b</sup>



#### F) Diterpenoides de tipo Dicassano

A diferencia de la mayoría de los furanoditerpenoides, un inusual dímero **taepenina J (25)**<sup>17c</sup> se identificó a partir de las semillas de *C. crista*.

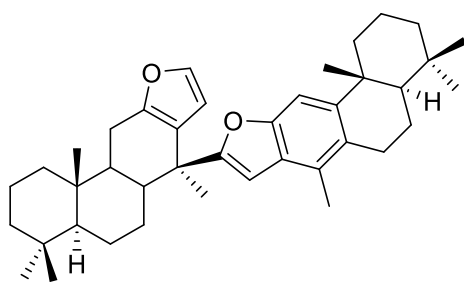
#### G) Otros diterpenoides de tipo cassano

Muy recientemente se han descrito nuevos ejemplos de cassano, que poseen un quinto anillo tetrahydrofuránico, como **3-hidroxiphanginin H (26)**, aislado de *Caesalpinia sappan*. Este compuesto presenta actividad frente a la línea humana de cáncer pancreático SW1990.<sup>22</sup>

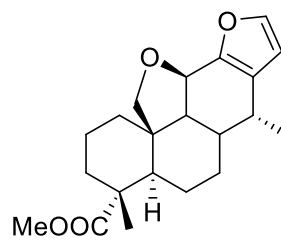
<sup>21</sup> Kalauni SK, Awale S, Tezuka Y, Banskota AH, Linn TZ, Asih PB, Syafruddin D, Kadota S. Antimalarial activity of cassane-and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* and their structure-activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(5):1050-2.

<sup>22</sup> Qiao Y, Xu Q, Hu Z, Li XN, Xiang M, Liu J, Huang J, Zhu H, Wang J, Luo Z, Xue Y. Diterpenoids of the cassane type from *Caesalpinia decapetala*. *Journal of natural products*. 2016 Dec 23;79(12):3134-42.





25



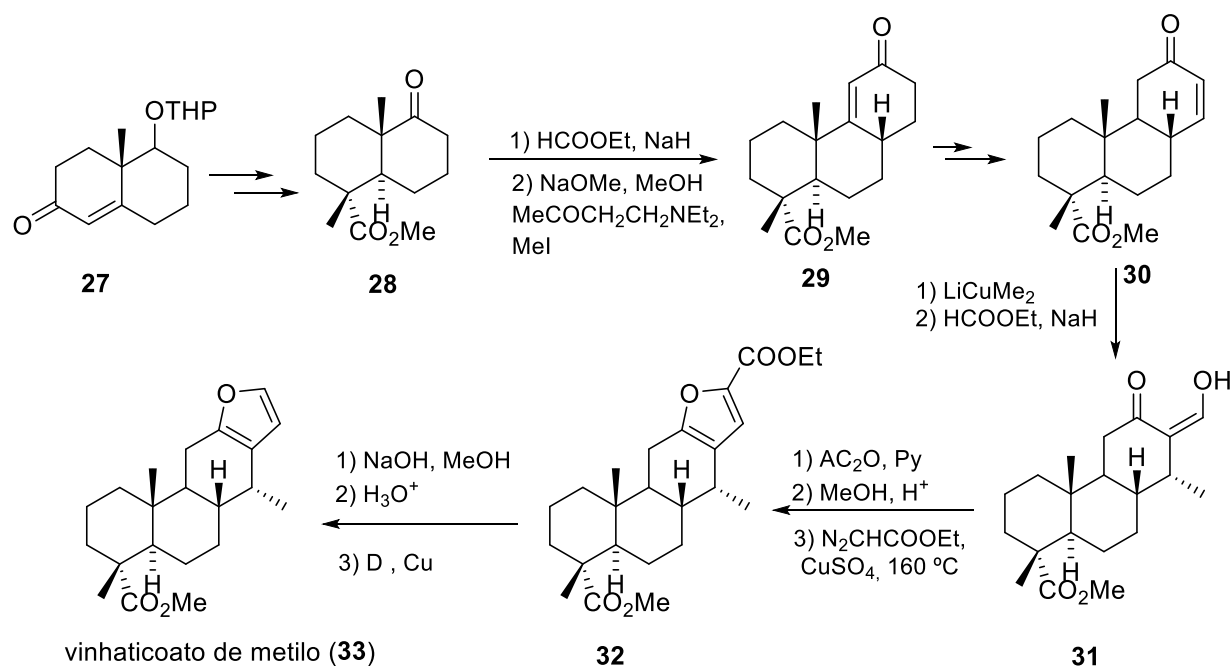
26

### 1.3.2. Síntesis de diterpenos tipo cassano con anillo C no aromático

A pesar del interés de este tipo de compuestos, se ha investigado poco acerca de su síntesis, especialmente los cassanos con anillo C aromático. Curiosamente los que poseen el anillo C no aromático fueron los primeros en ser objeto de estudios sintéticos. En 1963, Spencer et al describen la síntesis racémica de vinhaticoato de metilo (**33**) a partir de la enona **27**, obtenida de la cetona de Weiland-Miescher.<sup>23</sup> Estos autores creyeron haber descrito la síntesis racémica de vinhaticoato de metilo (**33**); sin embargo, siguiendo los distintos pasos del proceso, se comprueba que en realidad sintetizaron un diastereoisómero del producto, ya que la configuración del C-5 es contraria a lo que ellos expusieron.

El anillo C del esqueleto de cassano se elaboró mediante anelación de la cetona **17**, via su  $\alpha$ -hidroximetilén derivado, que proporcionó la enona **29**. El grupo metilo en C-14, característico de la molécula objetivo, se introdujo mediante adición conjugada sobre la  $\alpha$ ,  $\beta$ -enona **30**. El anillo furánico del producto final se generó mediante tratamiento de la  $\alpha$ -metoximetilencetona derivada del hidroximetilén derivado **31**, con diazoacetato de etilo en presencia de sulfato de cobre a 160°C (Esquema 9).

<sup>23</sup> Spencer TA, Villarica RM, Storm DL, Weaver TD, Friary RJ, Rosier J, et al. Total Synthesis of Racemic Methyl Vinhaticoate. *J Am Chem Soc.* 1967;89(21):5497–9.

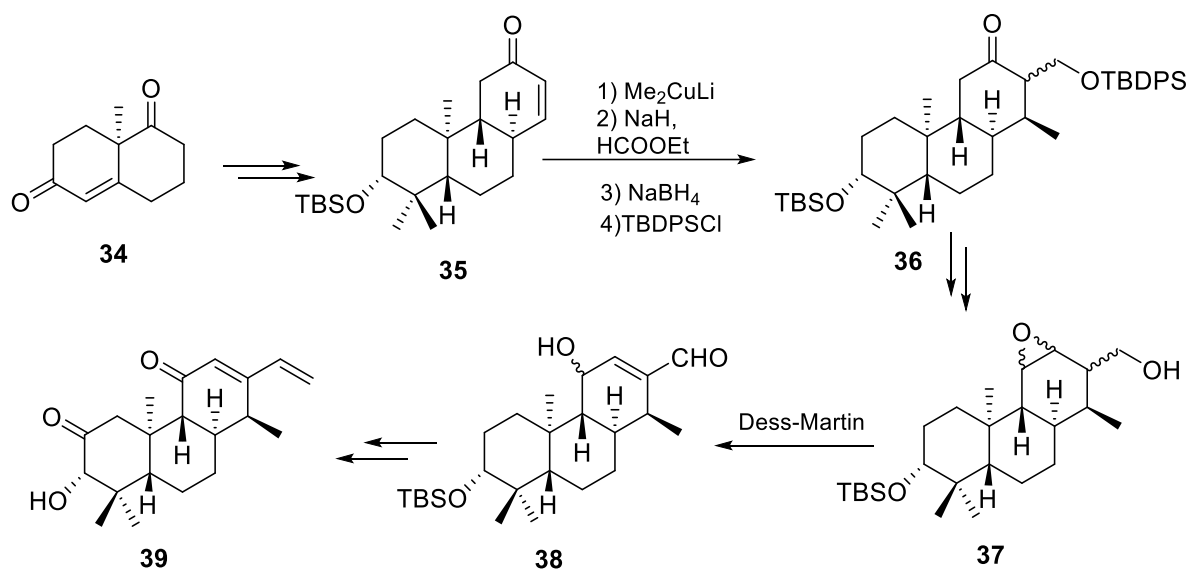


**Esquema 9.** Síntesis racémica de vinhaticoato de metilo (**33**).

En 2000, Mori y Yajima han descrito la síntesis de (-)-phytocassano D (**39**) a partir de la (R) cetona de Weiland-Miescher (**34**) (Esquema 10).<sup>24</sup>

El anillo C del esqueleto de cassano se construyó de un modo similar al llevado a cabo por el grupo de Spencer. Asimismo, el grupo metilo en el C-14 se introdujo mediante tratamiento de la enona **35** con dimetilcuprato de litio, mientras que el grupo vinilo en C-13 se elaboró mediante reacción de Wittig sobre el aldehído **38**, obtenido a partir del epoxialcohol **37**. Tras sucesivas oxidaciones se obtuvo el (-)-phytocassano D (**39**).

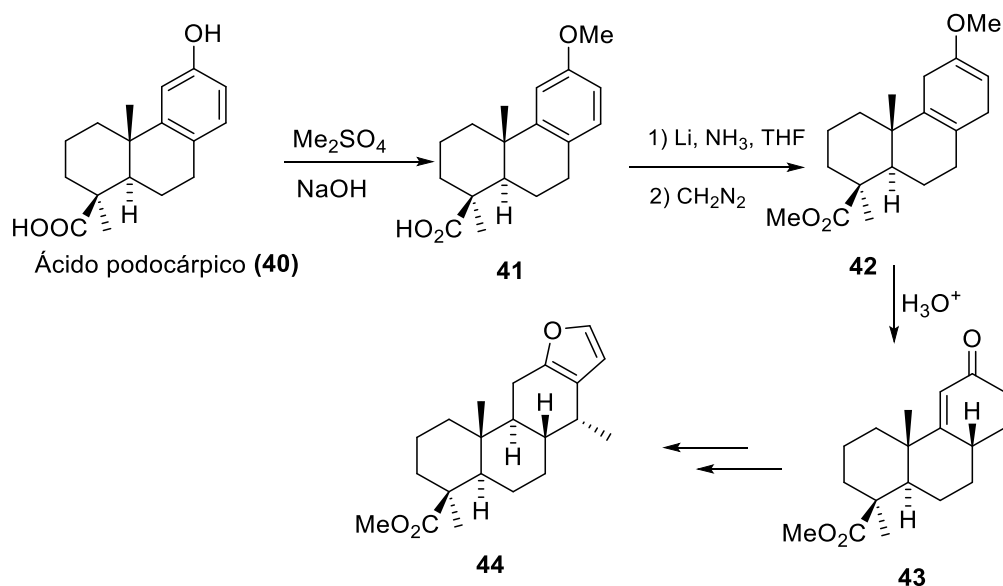
<sup>24</sup> Yajima A, Mori K. Diterpenoid total synthesis, XXXII. Synthesis and absolute configuration of (-)-phytocassane D, a diterpene phytoalexin isolated from the rice plant, *Oryza sativa*. *European J Org Chem*. 2000;(24):4079–91.



**Esquema 10.** (-)-phytocassano D (**39**) a partir de la (R) cetona de Weiland-Miescher (**34**).

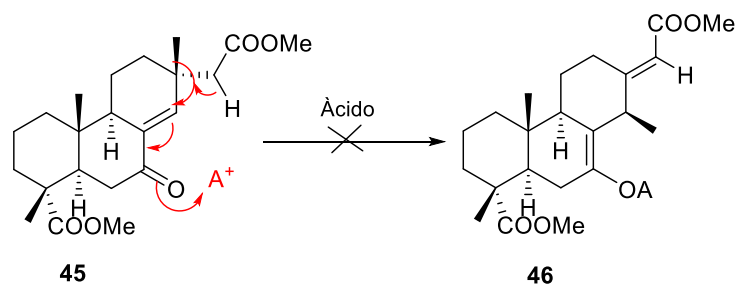
En lo que respecta a la semisíntesis de cassanos a partir de precursores naturales, se han propuesto algunas aproximaciones.

En 1971 Spencer et al, describen la síntesis enantioespecífica de (+)- vouacapenato de metilo (**44**) a partir de ácido podocárpico (**40**). (35) La etapa clave del proceso es la reducción de Birch del metoxiderivado **41**, que proporcionó la  $\alpha$ ,  $\beta$  -enona (**43**), ácido epímero en C-4 del éster **29**. La posterior transformación de **43** en el compuesto final **44**, se llevó a cabo de un modo similar al descrito en el esquema 9. (Esquema 11).



**Esquema 11.** Síntesis enantioespecífica de (+)- vouacapenato de metilo (**44**) a partir de ácido podocárpico (**40**).

Los precursores más inmediatos de los cassanos, de acuerdo con su biosíntesis, serían terpenoides con esqueleto de pimaránico. En 1973, el grupo de Overton ensayó, infructuosamente, la transformación del cetoéster **45**, con esqueleto de pimaránico, en el correspondiente derivado de cassano **46**, bajo diferentes condiciones ácidas.<sup>25</sup> Ensayos posteriores, investigados por otros grupos, también resultaron infructuosos.<sup>26</sup>



**Esquema 12.** Pimaranos como precursores inmediatos de cassanos (Overton et al. 1973)

### 1.3.3. Síntesis de diterpenos tipo cassano con anillo C aromático

El grupo de investigación de Pitsinos fue el primero en aproximarse a la síntesis de cassanos con anillo C aromático, en su intento de sintetizar la taepenina D (**15**) con objeto de explorar su potencial terapéutico. Para ello, utilizó como material de partida, un derivado de ácido deshidroabiético (**50**) que se preparó a partir de ácido abiético (**51**). Este derivado, que carece de funcionalización en su C-14, no resultó adecuado para su transformación en estructuras con esqueleto cassano. Sin embargo, los autores de este trabajo lo aprovecharon para preparar moléculas análogas de cassanos, con objeto de estudiar la relación estructura-actividad (SAR) de la taepenina D (**15**)<sup>27</sup>. (para más detalles, ver la síntesis de análogos de cassanos).

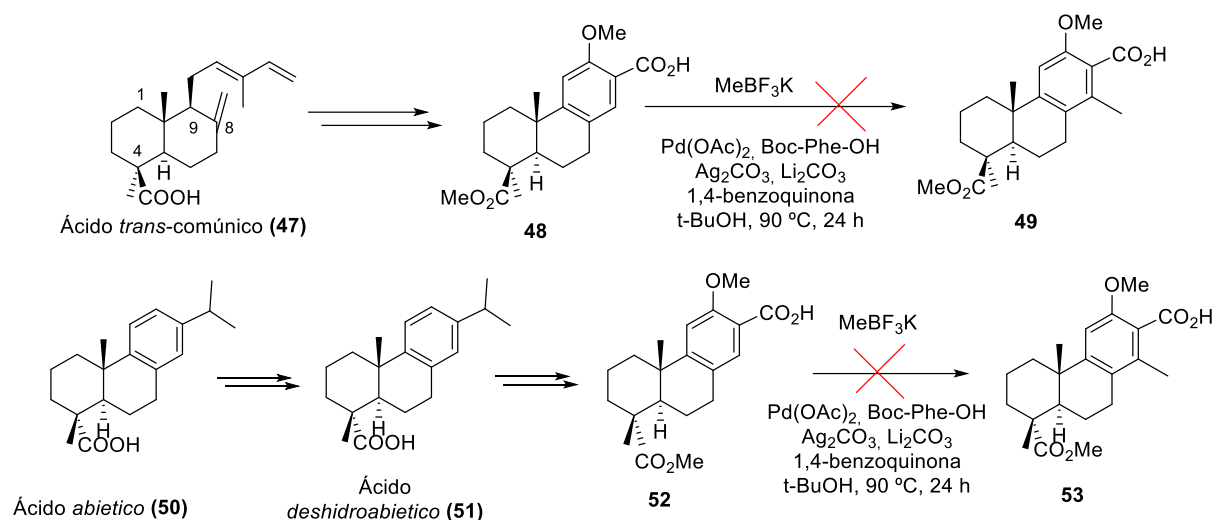
Una pregunta evidente que se puede plantear cuando uno repasa el trabajo de Pitsinos y sus colaboradores, es ¿Por qué no se ensayaron sustancias con esqueleto cassano en los estudios biológicos? La respuesta a esta pregunta genera muchas dudas sobre la viabilidad del uso del ácido deshidroabiético (**51**) como materia prima para acceder a sustancias con esqueleto cassano.

<sup>25</sup> Johnston, J.P. and Overton K. The pimarane→ cassane rearrangement. Synthesis of a potential intermediate from isopimaric acid. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1973;1:853–8

<sup>26</sup> Ceccherelli P, Curini M, Pellicciari R, Baddeley GV, Raju MS, Wenkert E. Solvolysis of Virescenol B 19-Tosylate. *J Org Chem.* 1978;43(21):4244–5.

<sup>27</sup> Chatzopoulou M, Antoniou A, Pitsinos EN, Bantzi M, Koulocheri SD, Haroutounian SA, Giannis A. A fast entry to furanoditerpenoid-based Hedgehog signaling inhibitors: identifying essential structural features. *Organic letters.* 2014 Jun 20;16(12):3344-7.

Esta hipótesis se sustenta por trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación sobre el intento de introducir el grupo metilo en el C-14 en estructuras similares.<sup>28</sup> (esquema 13).

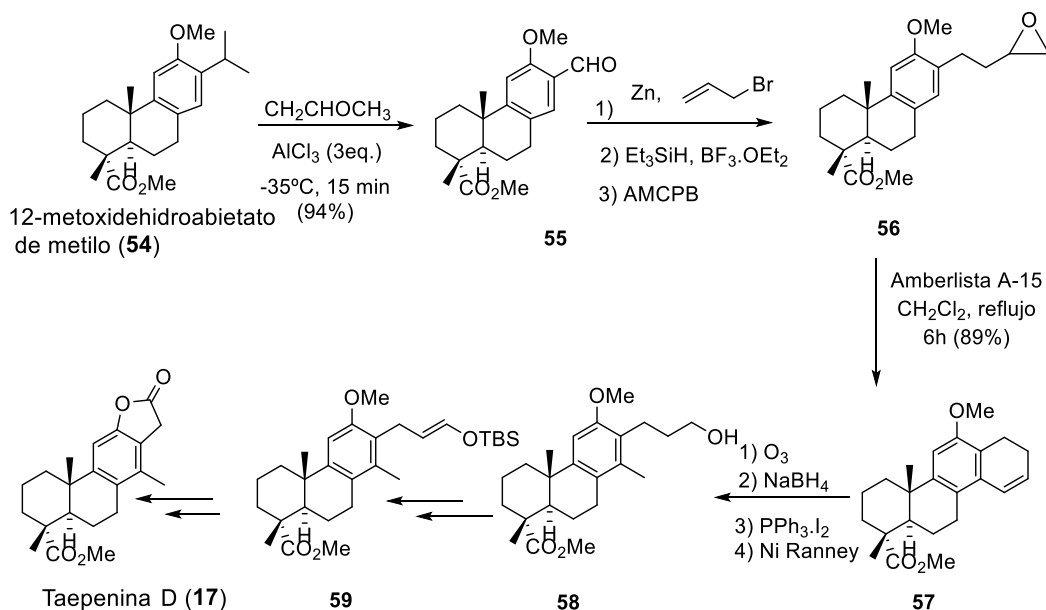


**Esquema 13.** Intento de orto-metilación a partir de los ácidos **48-52** mediante el procedimiento de Baran, realizado previamente en nuestro grupo.

### 1.3.4. Síntesis de taepeninas

En 2018, nuestro grupo de investigación logró solventar ese inconveniente, llevando a cabo, exitosamente, la primera estrategia hacia cassanos con anillo C aromático. La ruta sintética parte del ácido dehidroabiético (**51**) como material de partida, y fue aplicada a la síntesis de taepenina F (**17**)<sup>28a</sup>. Así, esta vía fue la primera vía que condujo a la introducción del grupo metilo en el C-14 a partir de un derivado de ácido dehidroabiético.

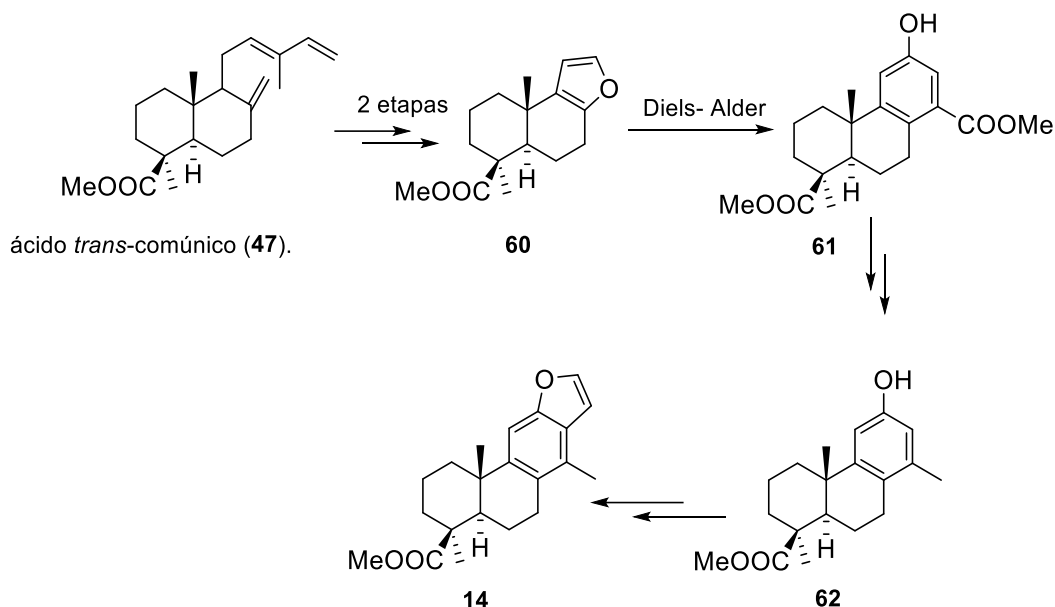
<sup>28</sup> a) Gutierrez P, Altarejos J, Linares-Palomino PJ, Chahboun R, Alvarez-Manzaneda E. Synthesis of cassane-type diterpenes from abietane compounds: The first synthesis of taepenin F. *Org Chem Front.* 2018; 5(17):2542–6. b) Mahdjour S, Harche-Kaid M, Haidour A, Chahboun R, Alvarez-Manzaneda E. Short Route to Cassane-Type Diterpenoids: Synthesis of the Supposed Structure of Benthaminin 1. *Org Lett.* 2016;18(22):5964–7.



**Esquema 14.** Síntesis de taepenina F (17) a partir de 12-metoxidehidroabiétato de metilo (54)

Sin embargo, la secuencia de síntesis resultó bastante larga, ya que se utilizaron 18 etapas para culminar la síntesis, entre las que destaca la reacción de sustitución ipso del grupo isopropilo con el grupo formilo sin epimerización del metilo sobre el C-10. Este paso, que se desarrolló con elevado rendimiento del aldehído **55**, se llevó a cabo mediante tratamiento del éster **54** con diclorometil metil éter, en presencia de  $\text{AlCl}_3$  a  $-35^\circ\text{C}$ . El aldehído **55** resultó clave para la introducción de la función carbonada en C-14, característica de los cassanos objetivo. En tres etapas, se transformó el aldehído **55** en el epóxido **56**, el cual sufre una fácil ciclación hasta el dihidronaftaleno derivado **57**, mediante tratamiento con resina catiónica. Por último, el grupo metilo en el C-14 se genera mediante ozonólisis reductora del doble enlace, yodación selectiva del grupo hidroxilo bencílico y posterior reducción con Niquel Raney del correspondiente yoduro bencílico. El compuesto **58** resultante, permitió obtener la lactona **17** mediante degradación de la cadena lateral, vía oxidación del derivado silil enol éter **59**<sup>28a</sup> (Esquema 14).

Ya en 2016, nuestro grupo, logró con éxito la primera síntesis de la bentaminina 1 (**14**), un furanoditerpenos tipo cassano con anillo C aromático, a partir del éster metílico del ácido *trans*-comúnico (**47**). Sin embargo, su estructura no resultó idéntica a la descrita en bibliografía, lo que sugiere la revisión de la estructura de bentaminina 1 (**14**).<sup>28b</sup> (Esquema 13)

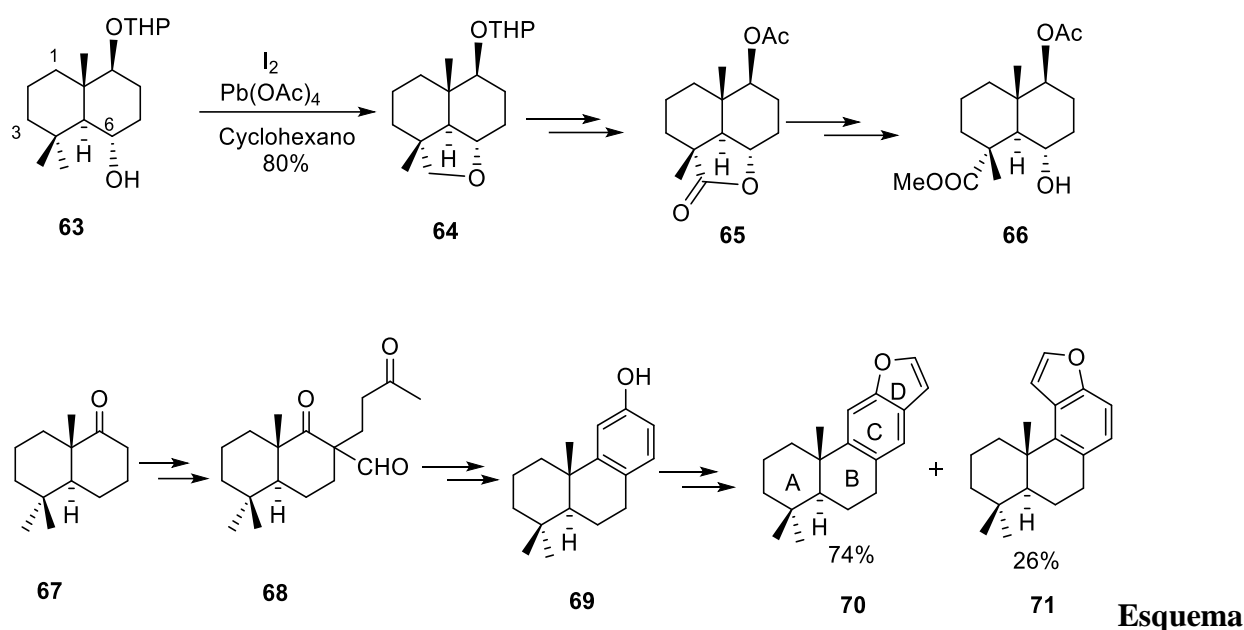


**Esquema 15.** Primera síntesis de furanoditerpenos tipo cassano aromático (Álvarez Manzaneda et al, 2016).

### 1.3.5. Aproximaciones Sintéticas hacia análogos de cassanos

Debido a la dificultad que, en general, entraña la síntesis de cassanos, se han realizado de forma directa o indirectamente estudios sintéticos hacia la obtención de análogos. En 2016, Ishikawa y su grupo de investigación(41), se aproximaron a la síntesis del esqueleto tetracíclico de taepenina D (**15**), utilizando una estrategia basada en la anelación de Robinson para formar el anillo C de los cassanos, a partir de una estructura decalínica adecuadamente funcionalizada. Por otra parte, estudiaron de forma separada la funcionalización del metilo ecuatorial del sistema *gem*-dimetilo del anillo A del biciclo **63**. Para ello, utilizaron otra estructura bicíclica similar que posee un grupo  $\alpha$ -hidroxilo situado en el C-6 del sistema decalínico. Dicha funcionalización se realizó vía el radical 6-alcoxi derivado, generado por tratamiento del alcohol **63** con  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  e yodo.<sup>29</sup> (Esquema 16)

<sup>29</sup> Nakazawa Y, Nagatomo M, Oikawa T, Oikawa M, Ishikawa Y. Studies directed toward synthesis of taepenina D: Construction of the C4 stereogenic center and the CD benzofuran rings. *Tetrahedron Lett* . 2016;57(24):2628–30.

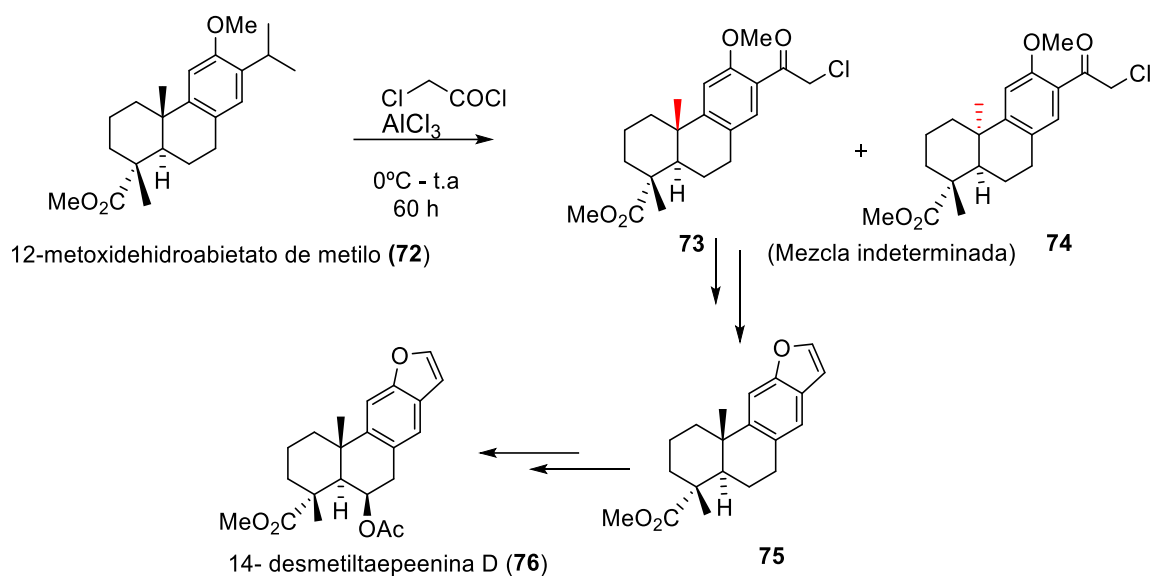


### 16. Estudio de Ishikawa y su grupo para la aproximación sintética hacia taepeenina D (15)

La semisíntesis de cassanos a partir de precursores naturales, simplifica considerablemente la ruta sintética hacia las moléculas objetivo. A priori, los diterpenos con esqueleto abietano, y en particular el ácido dehidroabiético (51) o sus derivados, pueden considerarse precursores adecuados para la síntesis de cassanos con anillo C aromático. Sin embargo, examinando la reactividad de estos precursores, se deduce la dificultad que entraña la introducción del grupo metilo en el C-14. Otro inconveniente importante, es la conversión del grupo isopropilo en derivados que pueden generar el anillo furánico.

Como ya se ha comentado con anterioridad, Pitsinos et al llevaron a cabo, en su intento de obtener la taepeenina D (15), la síntesis de la 14-desmetiltaepeenina D (76) a partir del ácido abiético (50). Sin embargo, utilizaron un derivado del ácido dehidroabiético (51) para aproximarse a la síntesis de la 14-desmetiltaepeenina D (72), ya que el ácido abiético (50) fue transformado en un derivado del ácido dehidroabiético, como es el intermedio 72. Para ello, realizaron la ipso desisopropilación-sustitución en condiciones de reacción de Friedel-Crafts del derivado 12-metoxidehidroabietato de metilo (72), obteniendo una mezcla indeterminada de los 10-epímeros 73 y 74. Con ello, han resuelto la transformación del grupo isopropilo en un grupo adecuado para generar el anillo furánico típico de este grupo de metabolitos. Sin embargo, estos autores no resolvieron el reto de la introducción del metilo en el C-14.<sup>27</sup>



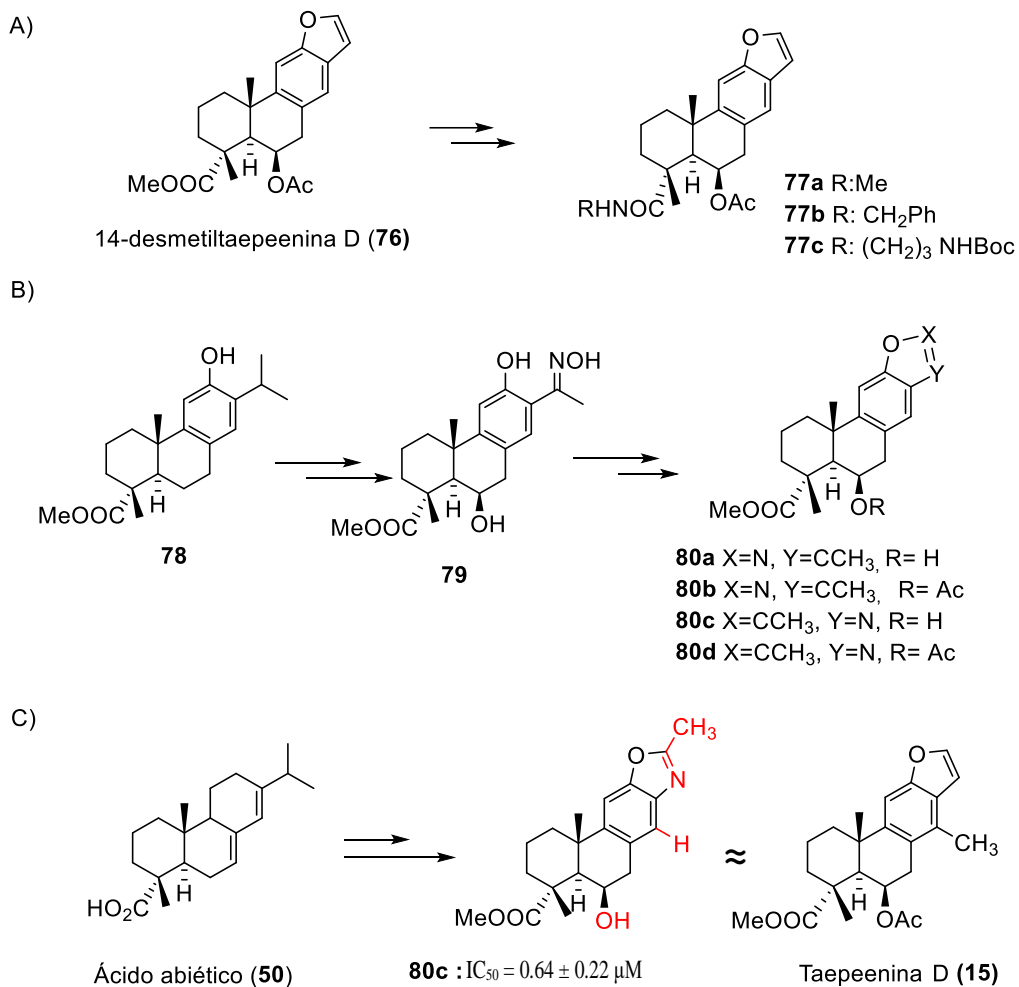


**Esquema 17.** Síntesis de 14-desmetiltaepeenina D (**76**) a partir de 12-metoxidehidroabietato de metilo (**72**).

Los autores de este trabajo, después de llevar a cabo los estudios biológicos sobre la 14-desmetiltaepeenina D (**76**) y otros derivados, afirmaron que el grupo metilo sobre el C-14 no resulta importante en la bioactividad de este compuesto, sin argumentarlo mediante un estudio biológico comparativo que afirmase tal conclusión. Otro dato importante del estudio biológico, sugiere que la presencia de un grupo acetato en el C-6 o del anillo D aromático, si son cruciales para la bioactividad de la taepeenina D (**15**).

Estos resultados motivaron al grupo de Pitsinos para proseguir en sus estudios sobre la relación estructura-actividad (SAR) de la taepeenina D (**15**). Para ello, llevaron a cabo la preparación de análogos denominados de segunda generación de la taepeenina D (**15**), utilizando la misma ruta sintética previamente descrita.<sup>30</sup> (Esquema 18)

<sup>30</sup>Antoniou A, Chatzopoulou M, Bantzi M, Athanassopoulos CM, Giannis A, Pitsinos EN. Identification of Gli-mediated transcription inhibitors through synthesis and evaluation of taepeenin D analogues. *Med chem comm.* 2016;7(12):2328–31.



**Esquema 18.** Síntesis de análogos de segunda generación de taepenina D (**15**).



# OBJETIVOS

## Objetivos

A la luz de todo lo expuesto anteriormente, se han planteado, en este primer capítulo, los siguientes objetivos:

1º- Estudio de una nueva vía hacia diterpenos de tipo cassano, a partir del ácido abiético (**50**) y su aplicación a la síntesis de taepeenina F (**17**) y derivados.

2º- Desarrollo de una estrategia directa hacia cassanos a partir de (+)- esclareolida (**99**), la cual será aplicada a la primera síntesis de (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**).

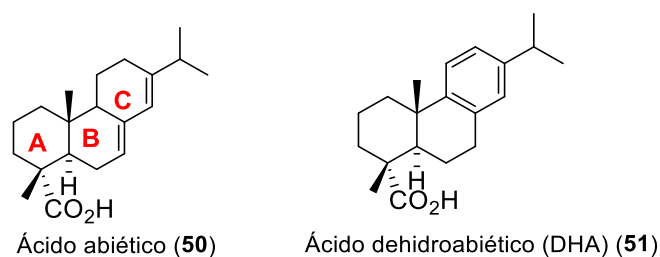
3º- El último objetivo de este capítulo se reservará a la síntesis de algunos nuevos análogos de cassanos desmetilados en su C-14 a partir del ácido deshidroabiético (**51**) y otros análogos bicíclicos y tricíclicos que serán abordados a partir del  $\beta$ -ciclocitral (**124**).

# RESULTADOS Y DISCUSION

## 1. Síntesis de la taepeenina F (17) a partir de (-)- ácido abiético (50)

Como se puso de manifiesto en los antecedentes bibliográficos de esta memoria, son pocas las vías de síntesis hacia diterpenos de tipo cassano llevados a cabo hasta la fecha. La mayoría de estas vías son aproximaciones sintéticas o estudios hacia la obtención de análogos. Actualmente, sólo se han desarrollado con éxito dos estrategias que han conllevado a la síntesis de bentaminina 1 (14) y taepeenina F (17)<sup>28</sup>. Ambas síntesis han sido descritas por nuestro grupo de investigación.

Estructuralmente, el ácido abiético (50) parece el producto de partida más adecuado para aproximarse a la síntesis de moléculas con esqueleto cassano. La presencia del doble enlace  $\Delta^{13,14}$  podría ser la llave para la introducción del grupo metilo en el C-14. Otras ventajas del uso de esta materia prima son su disponibilidad a nivel comercial y su módico precio.

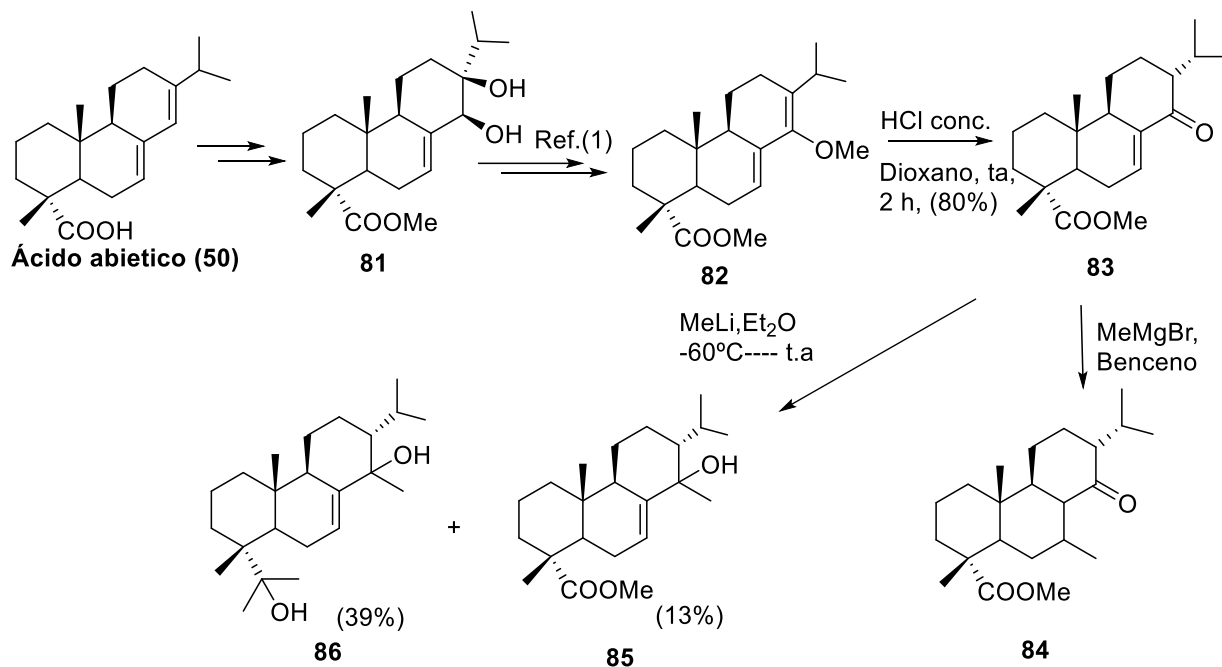


**Figura 2.** Diterpenos naturales utilizados como materia prima: ácido abiético (50) y dehidroabiético (51).

Teniendo en cuenta que la introducción del grupo metilo en el C-14 del anillo aromático no resulta fácil, decidimos estudiar su introducción previamente a la aromatización del anillo C. Esto sería planteable si se utiliza el ácido abiético (50) como materia prima. Para ello, se utilizaron algunos resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en la síntesis formal del inmunosupresor (-)-triptolida, a partir del ácido abiético (50), para convertirlo en intermedios factibles para la introducción del grupo metilo en el C-14.

Inicialmente, se investigó la introducción del grupo metilo sobre la cetona conjugada **83**, la cual se preparó en cuatro etapas a partir del ácido abiético (50)<sup>1</sup>. Sin embargo, la reacción de adición del bromuro de metil magnesiano sobre la enona **83** provocó la adición (1,4), es decir, adición sobre el C-7 en lugar de adición (1,2) sobre el grupo carbonilo. La reacción de adición de metillitio, más reactivo que el reactivo de Grignard,

condujo al producto deseado, pero con un rendimiento muy bajo 13%, junto al producto de doble adición tanto sobre el grupo carbonilo conjugado como sobre el grupo éster, como producto mayoritario de reacción con 39% de rendimiento. (Esquema 19)



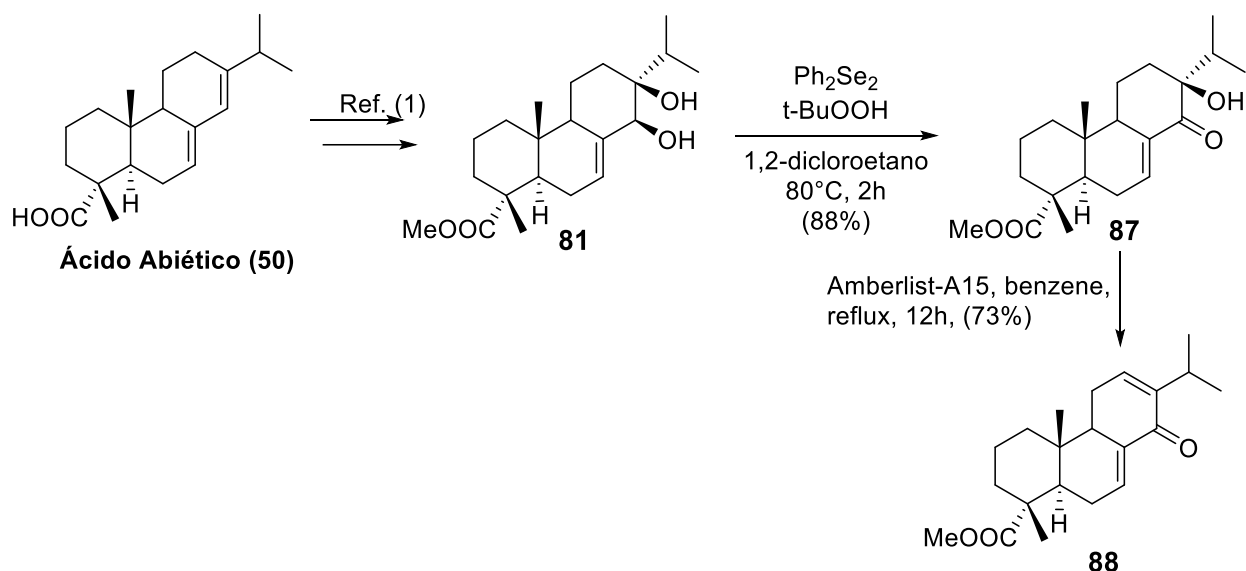
**Esquema 19.** Intento de metilación en C-14 a partir de la  $\alpha,\beta$ -enona **83**, realizado previamente en nuestro grupo

El análisis de estos resultados de investigación, pone de manifiesto la baja reactividad del grupo carbonilo de la enona debido a efectos electrónicos, ya que el doble enlace estabiliza el grupo carbonilo y sobre todo a efectos de naturaleza estérica, ya que dificultan la aproximación del reactivo tanto por la cara alfa, debido a la disposición ecuatorial del grupo isopropilo, como por la cara beta, manifestados por el metilo sobre el C-10 en disposición axial. De modo que la reactividad del grupo carbonilo baja considerablemente y se asemeja a la reactividad del grupo éster situado sobre el C-4, de ahí el resultado de doble ataque nucleofílico.

Para solventar este inconveniente, se decidió utilizar la dienona **88** cuya estructura manifiesta menos efectos estéricos alrededor del grupo carbonilo, ya que dispone del grupo isopropilo sobre un carbono  $sp^2$  que lo deja situado en el mismo plano que el grupo carbonilo. Esto, a priori, hace factible la reacción de adición del metillitio por la cara alfa y presumiblemente favorecería el ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo cetónico.

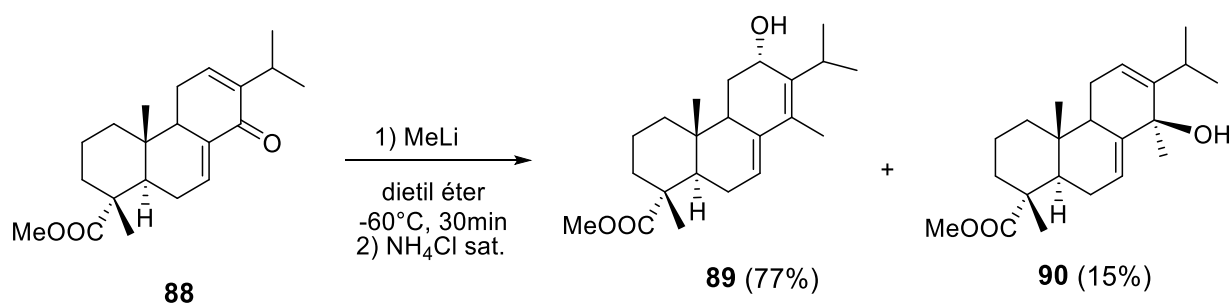


Por otra parte, la dienona **88** resulta más fácil de preparar a partir del ácido abiético (**50**) siguiendo el procedimiento llevado a cabo por nuestro grupo de investigación <sup>1</sup> (Esquema 20)



Esquema 20-A. Preparación del dienona **88**

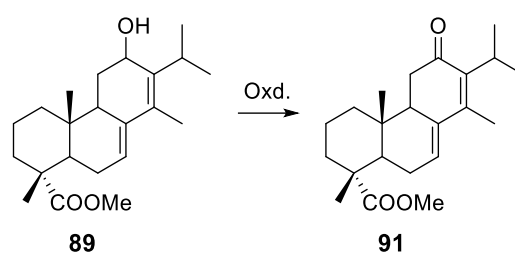
Con esta premisa, se preparó la hidroxienona **87** siguiendo el mismo procedimiento descrito por nuestro grupo de investigación <sup>1</sup>. La deshidratación de **87** mediante resina catiónica Amberlist A-15, condujo a la dienona **88** con un rendimiento del 73%. La subsiguiente reacción de **88** con MeLi en dietiléter a  $-60^\circ\text{C}$  proporcionó sorprendentemente, tras 30 min de reacción, el alcohol **89** como producto mayoritario de la reacción (77%), junto a un 15 % del alcohol **90**, sin detectar reacción alguna de adición sobre el grupo éster. (Esquema 20-B)



Esquema 20-B: reacción de **88** con MeLi

La formación del alcohol 2° **89** a partir del alcohol 3° **90** debe transcurrir vía un proceso tipo  $\text{S}_{\text{N}}1$ . La disposición alfa del grupo hidroxilo en el C-12 que se estableció mediante

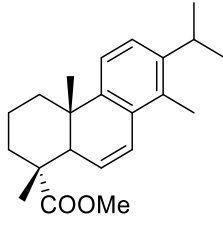
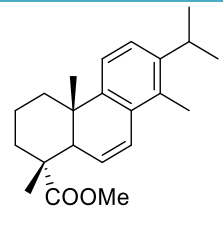
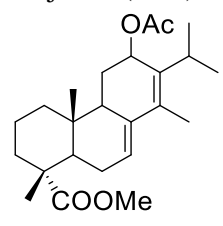
experiencias de noe diferencial, cabe atribuirla al ataque nucleofílico favorable por la cara alfa al catión alílico, debido a la proximidad de la agrupación metilo axial sobre el C-10. El siguiente paso de la secuencia, implica la oxidación del dienol **89** a dienona **91** con estructura análoga a dienonas naturales. Aunque en un principio esta etapa podía parecer sencilla, no resultó nada fácil conseguir el objetivo. Se ensayaron numerosas condiciones de reacción cuyos resultados se resumen en la siguiente tabla. (Tabla 3)



**Tabla 3.** Ensayos de oxidación del dienol **89**

Entrada	Oxidante	Condiciones de reacción	Resultado (%)
<b>1</b>	PDC (2eq.)/celita	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> anh., T.a., 2h	Objetivo (35%) + mezcla compleja
<b>2</b>	MnO <sub>2</sub> (20 eq.)	CHCl <sub>3</sub> , reflujo, 48h	No reacciona
<b>3</b>		THF anh., reflujo, 24h	No reacciona
<b>4</b>	Jones	Acetona, 0°C, 5 min.	Mezcla compleja
<b>5</b>	PDC cat./t-BuOOH (exc.)	Benceno anh., T.a.,	Objetivo (12%) + mezcla compleja
<b>6</b>	Anh. bencenoselenínico	1.2 eq., Benceno anh. Reflujo, 2 h 30min.	Objetivo (33%)
<b>7</b>	(1.1 eq) Ph <sub>2</sub> Se <sub>2</sub> / (1.5 eq)t-BuOOH	CCl <sub>4</sub> , reflujo, 2h	 <b>92</b> 20% + mezcla compleja

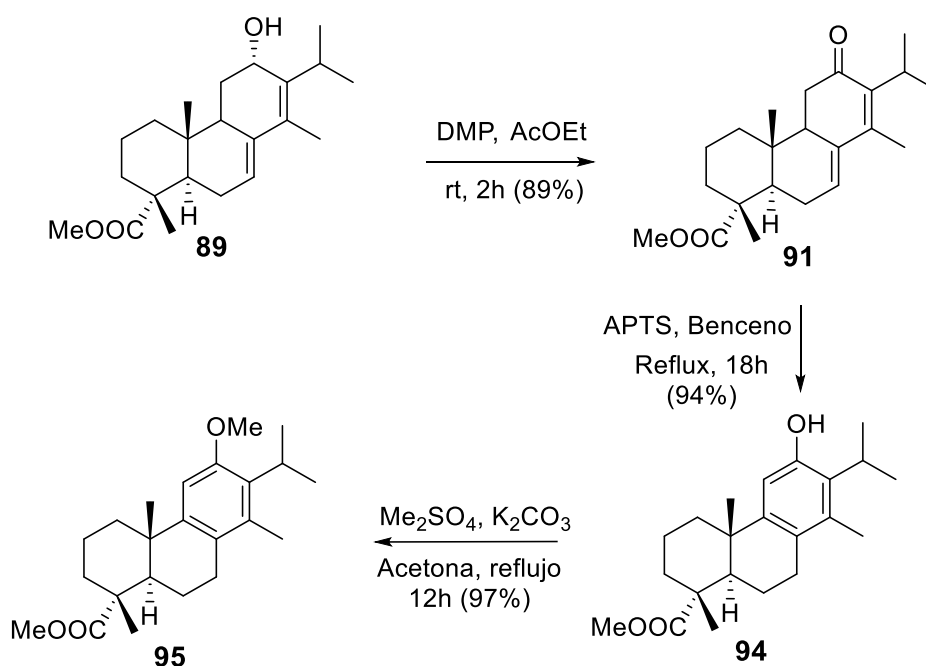
CAPÍTULO I: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8	Anh. bencenselenínico	4.2 eq., THF anh., reflujo, 1 día	Objetivo (44%) + Prod. Part. (22%)
9	Anh. bencenselenínico	6 eq., THF anh., reflujo, 1 días	Objetivo (65%) +  <b>92</b> (10%) + Prod. Part. (15%)
10	1.5 eq DDQ	Dioxano, T.a., 1h	 <b>92</b> (90%)
11	1.2 eq DMP	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> anh., T.a., 30 min.	Objetivo (30%) +  <b>93</b> (50%)
12	1.2 eq DMP	AcOEt, T.a., 2h	Objetivo (90%) + P.Part. (5%)
13	1.2 eq IBX	AcOEt, T.a.-80°C, 1 día	Objetivo (70%) + P.Part. (10%)
14	1.2 eq IBX	DMSO, T.a.-80°C, 4 días	Objetivo (30%) + P.Part. (40%)

Como se observa, el dienol **89** permaneció inalterado tras tratamiento con MnO<sub>2</sub> a reflujo bajo diferentes condiciones, mientras la reacción con el reactivo de Jones condujo a una mezcla compleja. El primer resultado positivo se logró mediante el uso de IBX, en este caso se obtuvo un 70% de la dienona deseada **91**, quedando el producto de partida sin reaccionar. El resultado excelente de oxidación del dienol, se consigue mediante tratamiento con DMP en EtOAc a temperatura ambiente, de manera que se obtiene la

dienona **91** con un rendimiento del 90%, junto con una pequeña cantidad del dienol **89** de partida (5%) (**Entrada 12**).

Una vez controlada la reacción de oxidación del dienol **89**, la dienona **91** resultante, se convirtió en el fenol **94** sometiéndola con APTS en benceno a reflujo durante 18 horas. El fenol **94** se protege en forma de metiléter derivado con el fin de obtener un intermedio adecuado para llevar a cabo la reacción de ipso-sustitución del grupo isopropilo. (Esquema 21)

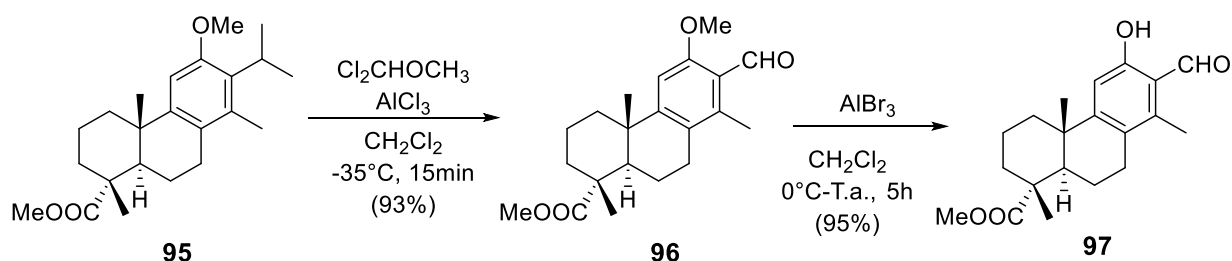


**Esquema 21.** Síntesis del intermediario clave **95**

### 1.1. Aplicación de los resultados obtenidos a la síntesis de la taepenina F (17)

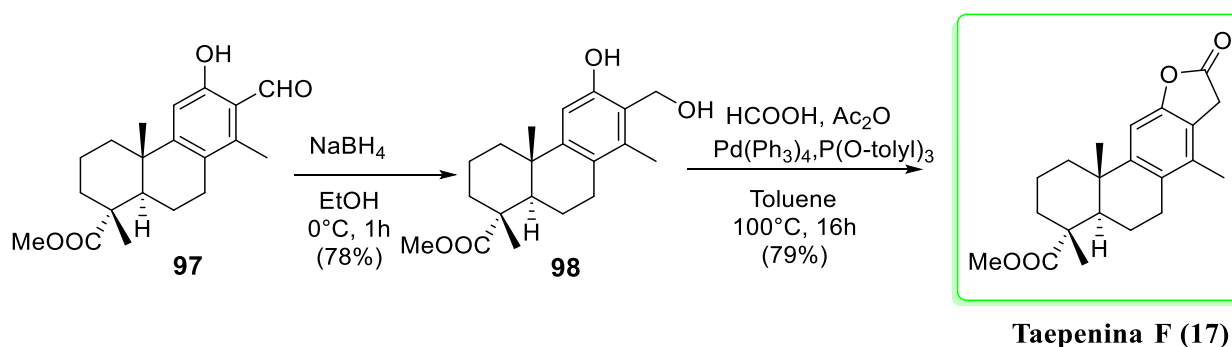
Una vez preparado el intermedio **95** que posee el grupo metilo en el C-14, la preparación de cassanos naturales como las taepeninas B, C, D o F se antojan muy fáciles, ya que la reacción de ipso-sustitución del grupo isopropilo con el grupo formilo u otro grupo adecuado está totalmente controlada. A continuación, fijamos nuestro objetivo en la síntesis de la taepenina F (**17**). Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la reacción de

sustitución ipso en C-13 bajo las mismas condiciones aplicadas al 12-metoxidehidroabiétato de metilo (**54**). En este caso, se obtuvo el aldehído **96** a partir del metoxiéster **95**, igualmente con alto rendimiento (93%). La subsiguiente reacción de desprotección del fenol con  $\text{AlBr}_3$ , condujo al *orto*-hidroxialdehído **97**. (Esquema 22)



**Esquema 22:** preparación del *orto*-hidroxialdehído (**97**).

Finalmente, el *orto*-hidroxialdehído **97** se transformó en el cassano objetivo, mediante reducción con  $\text{NaBH}_4$  y posterior lactonización mediante inserción de monóxido de carbono en el hidroxifenol **98** derivado, a través de una reacción catalizada por  $\text{Pd}(0)$ <sup>31</sup>. (Esquema 23)



**Esquema 23:** preparación de la taepenina F (**17**)

La taepenina F (**17**) se obtuvo como un sólido blanco, presentando propiedades físicas (p.f.  $193\text{-}195^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}25} = +25.0$  (c 0.6,  $\text{CHCl}_3$ )) similares a las descritas en bibliografía<sup>16a</sup> (para el compuesto natural (p.f.  $194\text{-}195^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}25} = +23.3$  (c 0.003,  $\text{CHCl}_3$ )).

<sup>31</sup> Li HP, Ai HJ, Qi X, Peng JB, Wu XF. Palladium-catalyzed carbonylative synthesis of benzofuran-2(3H)-ones from 2-hydroxybenzyl alcohols using formic acid as the CO source. *Org Biomol Chem*. 2017;15(6):1343–5.

## CAPÍTULO I: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados permiten confirmar, de forma inequívoca, la estereoquímica absoluta de la tapeenina F (**17**) natural. Además, sus datos de RMN, mostrados en la tabla 4, coinciden con los del compuesto natural reportados en la literatura

En resumen, se describe la primera síntesis de tapeenina F (**17**), un diterpeno aromático tipo cassano con anillo C aromático a partir del (-)-ácido abiético (**50**). Los pasos clave de la secuencia sintética son la introducción del grupo metilo en el C-14 vía la dienona (**88**), la ipso-sustitución del grupo isopropilo y la reacción de inserción del monóxido de carbono para generar el anillo lactónico característico de la tapeenina F (**17**). La ruta estudiada serviría también para la preparación de tapeeninas B, C, y D.

<i>Posición</i> <i>Protón/Carbono</i>	<i>H-RMN</i> <i>Sintética</i>	<i>H-RMN</i> <i>Natural</i> <sup>16a</sup>	<i>C-RMN</i> <i>Sintética</i>	<i>C-RMN</i> <i>Natural</i> <sup>16a</sup>
1	2.25 m, 1.47 m	2.27 m, 1.47 m	38.6	38.4
2	1.73 m	1.79 m	18.7	18.5
3	1.78 m, 1.66 m	1.78 m, 1.65 m	36.7	36.5
4	—	—	47.7	47.6
5	2.18 (2.1, d)	2.19 (2.1, d)	44.4	44.2
6	1.52 m	1.54 m	21.6	21.4
7	2.69 m	2.74 m, 2.64 m	27.6	27.4
8	—	—	129.3	129.2
9	—	—	150.8	150.7
10	—	—	37.9	37.8
11	6.91 s	6.90 s	104.2	104.1
12	—	—	152.9	152.7
13	—	—	119.9	119.8
14	—	—	133.0	132.9
15	3.61 s	3.61 s	32.7	32.5
16	—	—	174.8	174.7
17	2.11 s	2.10 s	16.5	16.4

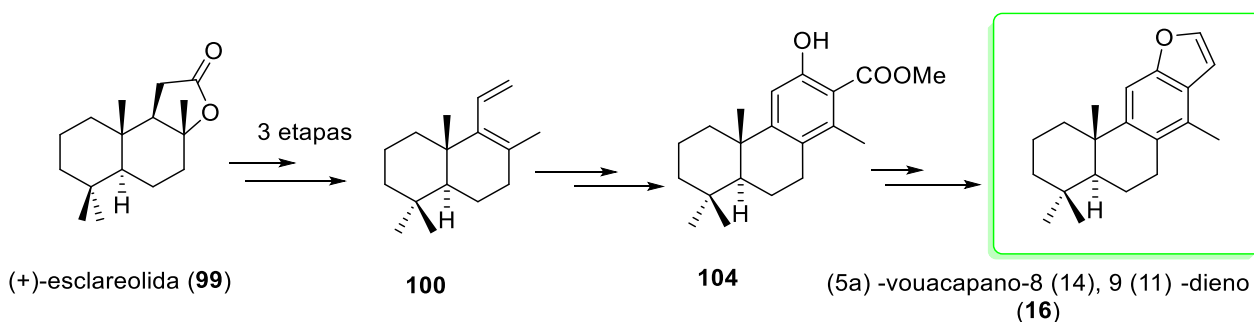
18	—	—	179.1	179.0
19	1.22 s	1.25 s	16.6	16.5
20	1.28 s	1.28 s	25.2	25.1
-OCOMe	3.68 s	3.68 s	52.1	52.0

**Tabla 4.** Asignación de señales de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$  (ppm)) para la taepenina F (17).  $\delta$  valores en ppm (valores de  $J$  en Hz cuando corresponda)

## 2. Síntesis del (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (16) a partir de (+)-esclareolida (99)

Teniendo en cuenta los datos bibliográficos anteriormente citados en los antecedentes, planteamos el estudio de una estrategia más eficiente hacia cassanos con anillo C aromático y nos fijamos en el (5 $\alpha$ )-vouacapano-8 (14), 9 (11) -dieno (16), un diterpenoide de tipo furanocassano que aún no ha sido sintetizado, y del que tampoco se ha estudiado su actividad biológica.

La estrategia que se pretende estudiar se basa en la construcción del anillo aromático, con la funcionalización adecuada para la preparación de cassanos, a partir de un proceso basado en la reacción de cicloadición del dieno terpénico **100**, fácilmente accesible a partir de (+)-esclareolida (**99**). (Esquema 24)



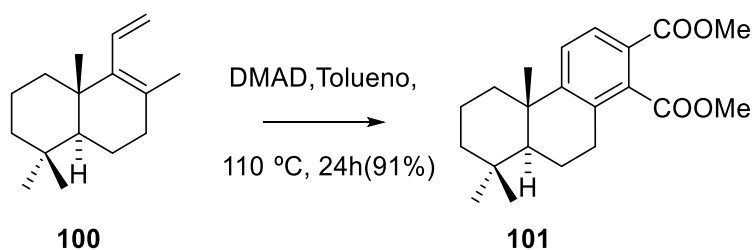
**Esquema 24.** Planteamiento sintético de (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**) a partir de (+)- esclareolida (**99**)

## 2.1. Síntesis de los fenoles 104 y 105

El dieno **100** se preparó a partir de (+) esclareolida (**99**) de acuerdo con el proceso llevado a cabo por nuestro grupo de investigación <sup>32</sup>. Una vez obtenido el dieno **100**, se ha llevado a cabo el estudio de la reacción de cicloadición de Diels-Alder con el propiolato de metilo y acetilendicarboxilato de metilo, bajo diferentes condiciones de reacción. Los resultados más relevantes se recogen a continuación.

Primero, se llevó a cabo la reacción de Diels-Alder del dieno **100** con el propiolato de metilo bajo diferentes condiciones de reacción. Sin embargo, en ningún caso se obtuvo un resultado positivo, ya que siempre se recuperó el dieno de partida inalterado, incluso cuando se sometió la reacción bajo presión o bajo catálisis de ácidos de Lewis.

En vista de estos resultados negativos, se propuso el uso de acetilendicarboxilato de metilo (DMAD) como dienófilo. Cuando se lleva a cabo la reacción en tolueno a reflujo, se obtiene el ftalato derivado **101** con un rendimiento del 91%, después de 24 horas de reacción.

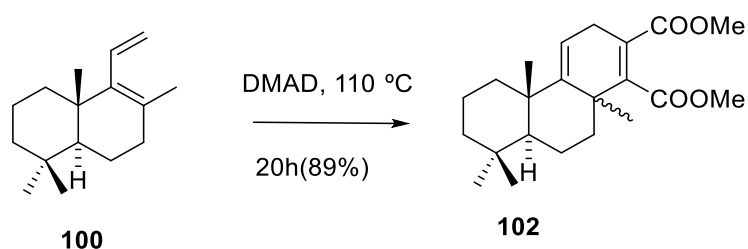


Por otra parte, cuando el dieno **100** se calienta sin disolvente, con DMAD en un tubo sellado a 110°C durante 20 h, se obtiene el cicloaducto deseado **102** en forma de mezcla de 8-epímeros con proporción 9: 1 del 8 $\alpha$ -metilo respecto al 8 $\beta$ -metilo. <sup>33</sup>

<sup>32</sup> a) Alvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Alvarez E, Ramos JM, Guardia JJ, Messouri I, Chayboun I, Mansour AI, Dahdouh A. Synthesis of (+)-hanagokenol A, (+)-fortunins E, G, H, and (-)-sugikurojin A from abietic acid. *Synthesis*. 2010 Oct;2010(20):3493-503. b) Alvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Cabrera E, Alvarez E, Haidour A, Ramos JM, Alvarez-Manzaneda R, Hmamouchi M, Es-Samti H.. A thermal 6 $\pi$  electrocyclization strategy towards taiwaniaquinoids. First enantiospecific synthesis of (-)-taiwaniaquinone G. *Chem Commun*. 2009;(5):592-4.

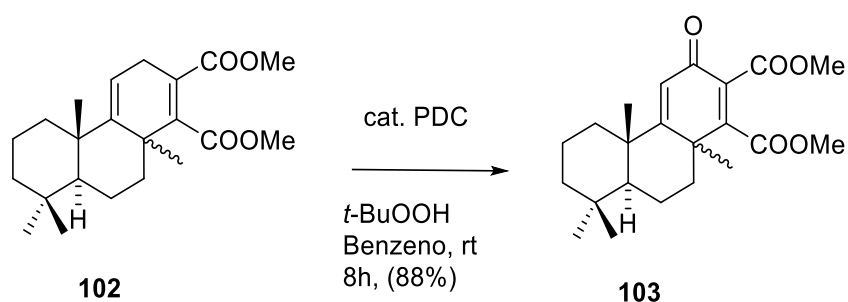
<sup>33</sup> Abad A, Agulló C, Castelblanque L, Cuñat AC, Navarro I, Carmen Ramírez de Arellano M. Synthesis of terpenoid unsaturated 1,4-dialdehydes.  $\pi$ -Facial selectivity in the Diels-Alder reaction of the 1-vinyl-2-methylcyclohexene moiety of polycyclic systems with DMAD. *J Org Chem*. 2000;65(13):4189-92.





Los derivados **101** y **102** se identificaron fundamentalmente en base a sus espectros de RMN- $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y en sus espectros de masas.

El siguiente paso de la secuencia, implica la reacción de oxidación del C-12 del cicloaducto **102**. Tras diversos ensayos utilizando diferentes condiciones de reacción, se obtuvo la dienona **103**, con buen rendimiento (88%), con PDC en condiciones catalíticas, e hidroperóxido de *tert*-butilo como cooxidante, en benceno a temperatura ambiente durante 8 horas.

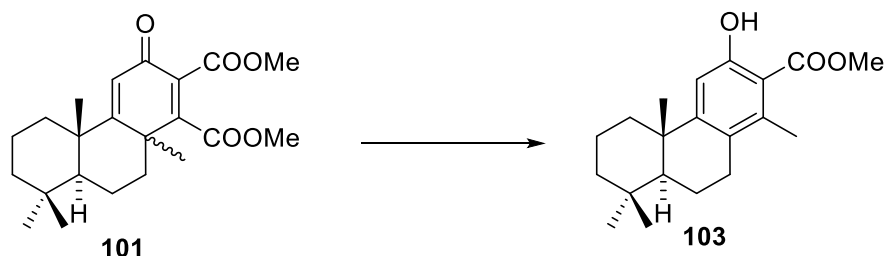


Esta dienona **103** presenta gran similitud estructural con dienonas naturales con esqueleto abietano, lo que la convierte en un precursor sintético apropiado para la síntesis de dichos derivados.

A continuación, se investigó el reordenamiento dienona-fenol. Después de ensayar la reacción de la dienona **103** con diferentes condiciones ácidas, la migración del grupo metilo y la decarboxilación simultánea tuvieron lugar cuando la dienona **103** se trató con  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlBr}_3$  o  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en diclorometano a temperatura ambiente (Tabla 5, entradas 5, 6 y 9), proporcionando así el hidroxiéster **104**.

La Tabla 5 resume las diferentes condiciones ensayadas y los respectivos resultados obtenidos. Como se observa en la tabla, los mejores resultados se lograron con el empleo de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente durante 15 h (Ensayo 9).

No se produjo reacción alguna cuando se utilizaron ácidos próticos, como TsOH y TfOH, y otros ácidos de Lewis, como Bi(OTf)<sub>3</sub> y Sc(OTf)<sub>3</sub>, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ya sea a temperatura ambiente o a reflujo. El tratamiento con BI<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente dio lugar a una mezcla compleja.

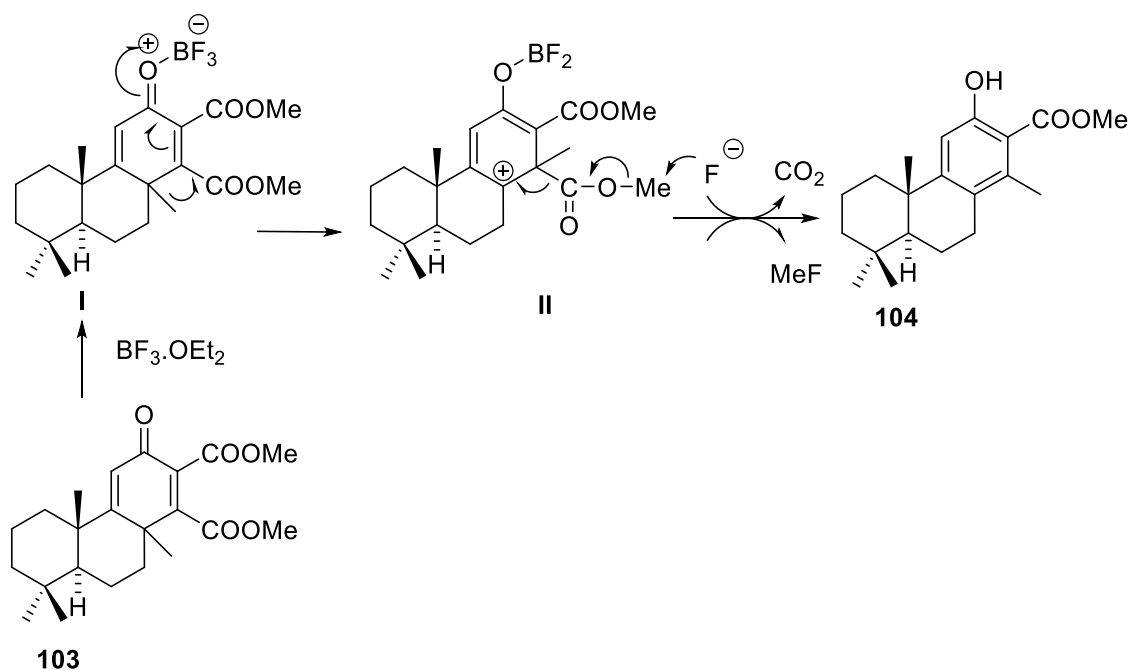


Ensayo	condiciones	Producto (%)
1	APTS, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , reflujo, 24 h	No RX
2	TfOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , reflujo, 24 h	No Rx + degradación
3	Bi(OTf) <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , reflujo, 12h	No. RX
4	Sc(OTf) <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , reflujo, 12h	No RX
5	AlCl <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 15h	62%
6	AlBr <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 15h	33%
7	FeCl <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 15h	No RX
8	Bl <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 15h	Mezcla compleja
9	BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 15h	89%

**Tabla 5.** Ensayos del reordenamiento dienona-fenol.

Un plausible mecanismo para esta insólita reacción, se postula en el siguiente esquema 24.<sup>34</sup>

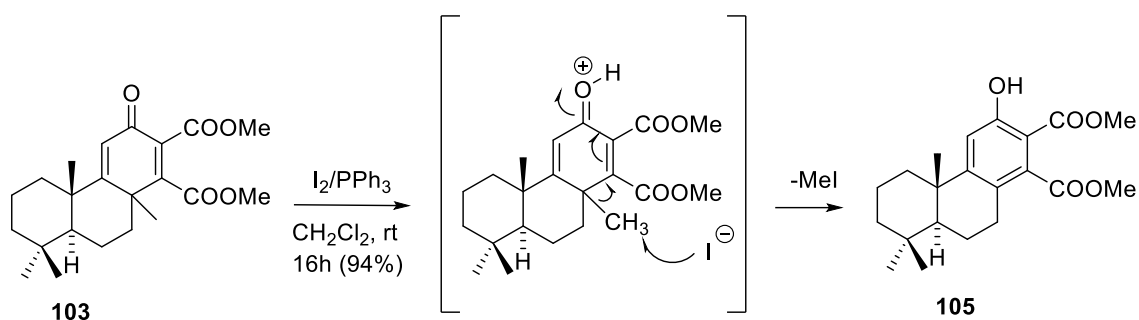
<sup>34</sup> a) Barnes, C. S.; Barton, D. H. R.; Fawcett, J. S.; Thomas BR. Triterpenoids. Part V I P Some Further Observations. *J Chem Soc.* 1952;2339–2347. b) Dauben WG, Ban Y, Richards JH. The Biosynthesis of the Triterpene, Eburicoic Acid: The Utilization of Methyl-labeled Acetate. *J Am Chem Soc.* 1956;78:5329–5335.



**Esquema 25.** Posible mecanismo para el reordenamiento dienona-fenol, con descarboxilación simultánea.

En primer lugar, se produce la coordinación del ácido de Lewis con el grupo carbonilo, provocando la migración del metilo del C-8 hacia el C-14 y la formación del carbocatión **II**. Luego, se produce el ataque del ion fluoruro sobre el grupo metilo del éster situado en el C-14 facilitando así, la descarboxilación y la aromatización del carbocatión **I** y la formación del fenol **104**. La estructura del fenol se estableció inequívocamente en base a experimentos de RMN 1D y 2D (TOCSY, HSQC, HMBC y NOESY).

Por otra parte, cuando se somete la dienona **103** a tratamiento con el sistema  $\text{I}_2/\text{PPh}_3$ , se forma el hidroxiéster **105** con alto rendimiento. En este caso, el ion yoduro con carácter nucleófilico fuerte, ataca el grupo metilo situado sobre el C-8, activado por la protonación del grupo carbonilo mediante ácido yodhídrico generado “en situ”, provocando la formación del fenol **105**. De esta manera, en el proceso, la dienona **103** pierde el metilo situado sobre el C-8 en forma de yoduro de metilo. El esquema 25 resume la propuesta mecanística del proceso.



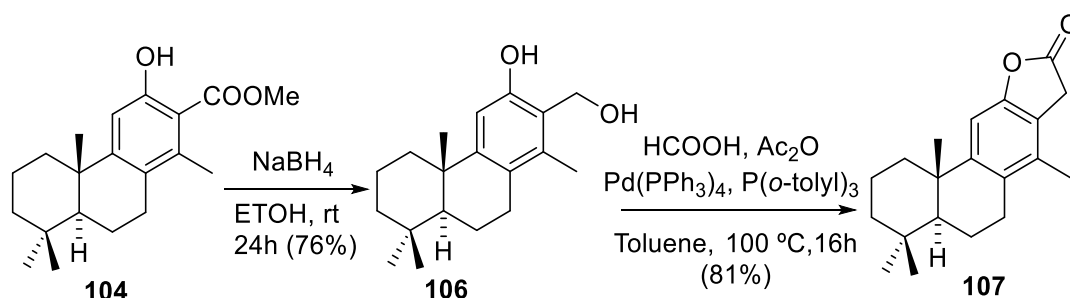
**Esquema 26.** Formación del dihidroxi ester **105** después del tratamiento de la dienona **103** con  $I_2 / PPh_3$

## 2.2. Aplicación del fenol (**104**) a la síntesis de diterpeno natural de tipo furanocassano (**5 $\alpha$** )-vouacapano-**8(14),9(11)**-dieno (**16**)

Para llevar a cabo este objetivo, se planteó una secuencia sintética de tres etapas:

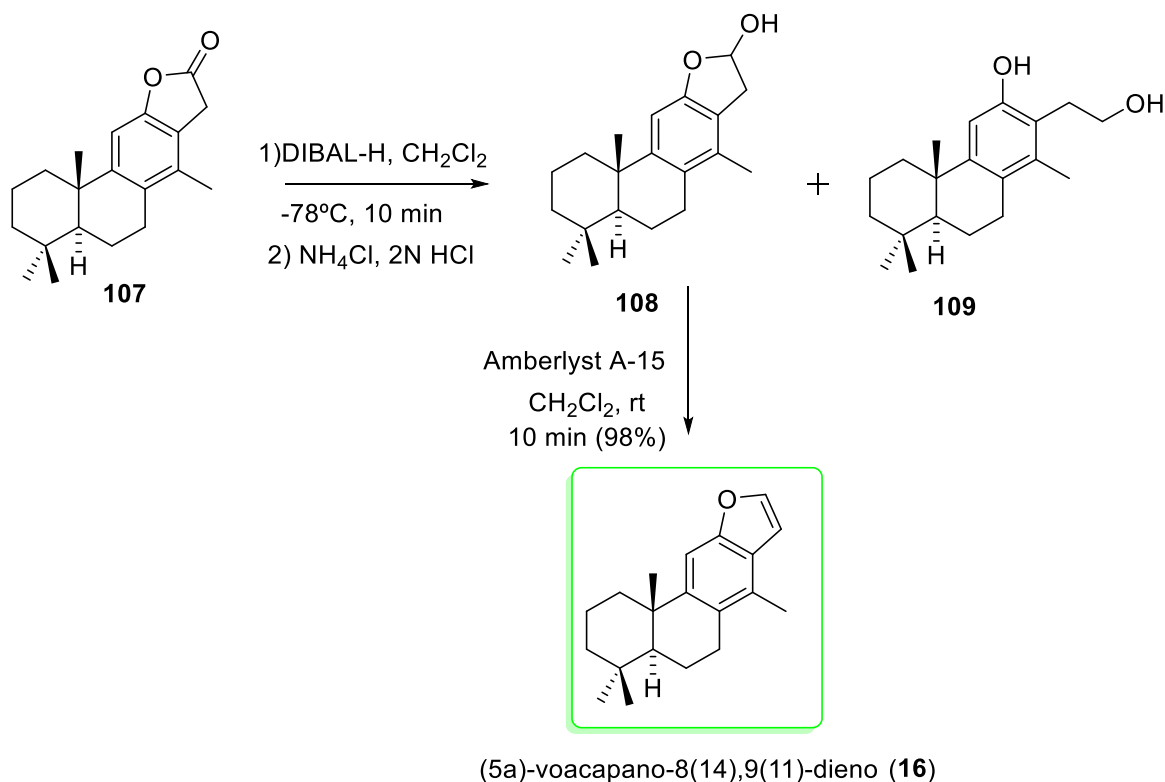
- En la primera, se reduce el éster metílico aromático del hidroxíster **104** y se inserta el monóxido de carbonilo, tal como se ha descrito en la síntesis de la taepenina F (**17**).
- La segunda etapa implica una reacción de reducción selectiva de la lactona **107**.
- Por último, se procede a la deshidratación del lactol resultante, para conseguir la síntesis del compuesto objetivo.

Así, se redujo el esterfenólico **104** con  $NaBH_4$  para obtener el hidroxifenol **106**. El subsiguiente tratamiento con el monóxido de carbono, generado con ácido fórmico y  $Ac_2O$  en presencia de  $Pd(0)$ , proporciona la lactona **107** con un rendimiento del 81%. (Esquema 26)



**Esquema 27.** Preparación de la lactona **107** a partir del fenol **104**

A continuación, se redujo la lactona **107** en el lactol **108** mediante DIBAL-H en diclorometano a  $-75^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, con un rendimiento del 71%. La reacción genera el diol **109** como subproducto de reacción, con un rendimiento del 22%. Finalmente, la deshidratación del compuesto **108** dio lugar a (5 $\alpha$ ) natural - vouacapano-8 (14), 9 (11) - dieno (**16**), aún no sintetizado. El (5 $\alpha$ ) natural - vouacapano-8 (14), 9 (11) -dieno (**16**) se obtuvo como un sólido blanco (pf  $50\text{-}51^{\circ}\text{C}$ ; lit.:30 pf  $48^{\circ}\text{C}$ ), presentando una rotación óptica ( $[\alpha]_{\text{D}_{25}} = +48,2$  (c 0,2,  $\text{CHCl}_3$ )). (Esquema 27)



**Esquema 28.** Elaboración del anillo furánico del (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**) a partir de la lactona **107**

Las propiedades espectroscópicas del compuesto **16** fueron idénticas a los reportados en la literatura <sup>2</sup>. (Tabla 6)

CAPÍTULO I: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<i>Position</i> <i>Protón/Carbono</i>	<sup>1</sup> H NMR <i>Natural</i> <sup>2</sup>	<sup>1</sup> H NMR <i>Sintética</i>	<sup>13</sup> C NMR <i>Natural</i> <sup>2</sup>	<sup>13</sup> C NMR <i>Sintética</i>
<b>1</b>	1.46 (m), 1.58 (m)	1.41–1.57 (m,2H)	28.02	28.00
<b>2</b>	1.51 (m), 1.72 (m)	2.75 (ddd, <i>J</i> = 17.0, 11.1. 8.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, <i>J</i> = 17.0, 6.7 Hz, 1H)	19.22	19.21
<b>3</b>	1.18 (m), 1.72 (m)	1.26 (m, 1H), 1.99 (m, 1H)	39.82	39.80
<b>4</b>	-	-	38.45	38.44
<b>5</b>	1.58 (m)	1.37 (dd, <i>J</i> = 12.6, 2.0 Hz, 1H)	49.90	49.88
<b>6</b>	1.64 (m), 1.87 (m)	1.64 (m, 1H), 2.34 (br d, <i>J</i> = 12.2 Hz, 1H)	19.53	19.51
<b>7</b>	2.73 (m), 2.91 (m)	2.70–2.84 (m, 2H)	41.70	41.66
<b>8</b>	—	-	127.74	127.73
<b>9</b>	—	-	147.97	147.96
<b>10</b>	—	-	48.49	48.47
<b>11</b>	7.32 (s)	7.36 (s, 1H)	104.42	104.93
<b>12</b>	—	-	153.57	153.53
<b>13</b>	—	-	125.19	125.16
<b>14</b>	—	-	128.08	128.07
<b>15</b>	6.70 (2.1; d)	6.74 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H)	105.42	104.40
<b>16</b>	7.50 (2.1; d)	7.52 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H)	144.08	144.07
<b>17</b>	2.34 (s)	2.36 (s, 3H)	15.90	15.90
<b>18</b>	0.94 (s)	0.96 (s, 3H)	33.27	33.32

<b>19</b>	0.96 (s)	0.98 (s, 3H)	21.81	21.71
<b>20</b>	1.22 (s)	1.24 (s, 3H)	25.40	25.39

**Tabla 6.** Asignación de señales de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$  (ppm)) para el ( $5\alpha$ ) natural - vouacapano-8 (14), 9 (11) -dieno (**16**).  $\delta$  valores en ppm (valores de  $J$  en Hz cuando corresponda)

Como puede apreciarse en los datos espectroscópicos comparativos de las dos sustancias, la natural y la que se obtuvo mediante síntesis, se observa similitud tanto en los datos RMN- $^1\text{H}$  como de RMN- $^{13}\text{C}$ , lo que indica que la estructura propuesta para el producto natural es correcta y la estereoquímica absoluta del producto natural también. En resumen, se elaboró por vez primera la síntesis de ( $5\alpha$ ) -vouacapane-8 (14) - 9 (11) -dieno (**16**), un furano diterpeno natural de tipo cassano, a partir de (+) - esclareolida (**99**) disponible comercialmente. La secuencia sintética es relativamente corta (10 etapas) y se desarrolla con la máxima economía de átomos, sin uso de grupos protectores, lo que permite clasificarla como una síntesis que se adapta a la química verde. Los pasos clave de la estrategia, son la reacción de cicloadición de Diels-Alder y el reordenamiento descarboxilativo de la dienona. La estrategia podría ser usada para sintetizar, en solo unos pocos pasos, una amplia variedad de tipos de diterpenoides con esqueleto cassano, incluidos los que tienen un anillo C saturado, similares a los compuestos (**12-17**), vía hidrogenación de intermedios como la lactona **107**. También podría ser aplicable a la síntesis de diterpenos funcionalizados en el anillo A, a partir de la (+)-esclareolida (**63**) funcionalizada en su anillo A, fácilmente obtenible en un solo paso<sup>35</sup>

<sup>35</sup> a) Laudadio G, Govaerts S, Wang Y, Ravelli D, Koolman HF, Fagnoni M, et al. Selective C(sp<sup>3</sup>)-H Aerobic Oxidation Enabled by Decatungstate Photocatalysis in Flow. *Angew Chemie Int Ed.* 2018;57(15):4078–82. b) Kawamata Y, Yan M, Liu Z, Bao DH, Chen J, Starr JT, Baran PS. Scalable, electrochemical oxidation of unactivated C–H bonds. *Journal of the American Chemical Society.* 2017 Jun 7;139(22):7448–51. c) Hall EA, Sarkar MR, Lee JHZ, Munday SD, Bell SG. Improving the Monooxygenase Activity and the Regio- and Stereoselectivity of Terpenoid Hydroxylation Using Ester Directing Groups. *ACS Catal.* 2016;6(9):6306–17. d) Czaplyski WL, Na CG, Alexanian EJ. C-H Xanthylation: A Synthetic Platform for Alkane Functionalization. *J Am Chem Soc.* 2016;138(42):13854–7 e) Canta i Roldós M, Font Gimbernat D, Gómez Martín L, Ribas Salamaña X, Costas Salgueiro M. The iron (II) complex [Fe (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (mcp)] as a convenient, readily available catalyst for the selective oxidation of methylenic sites in alkanes. © *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2014, vol. 356, p. 818-830. 2014.

### 3. Síntesis de los 14-desmetil análogos de cassanos a partir del ácido dehiroabiético (50)

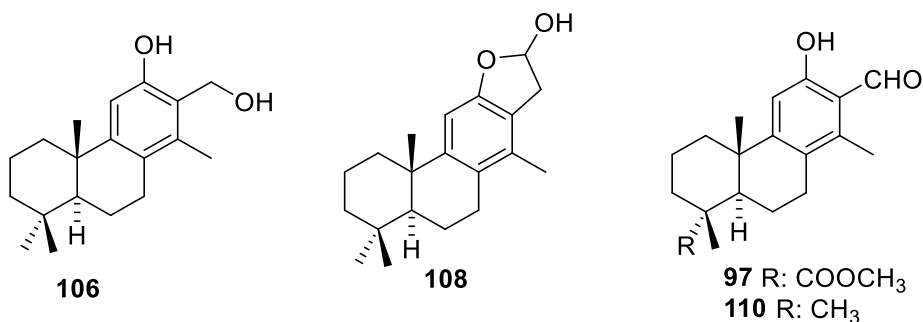
#### 3.1. Justificación

En vista de que no se han estudiado aún con profundidad las actividades farmacológicas de los diterpenos tipo cassano, sobre todo desde la perspectiva de la relación estructura-actividad (SAR), y de que las pocas aproximaciones publicadas hacia furanoditerpenos tipo cassano ponen de manifiesto la dificultad de la introducción del grupo metilo en C-14, característico de este esqueleto, se decidió investigar el potencial farmacológico de estos compuestos, con objeto de determinar la importancia del grupo metilo para la bioactividad de estos metabolitos.

Para ello, se planteó la preparación de análogos como 14-desmetil cassanos, a partir del ferruginol, ya que se caracteriza por la presencia del sistema *gem-dimetilo* en C18. Esto permitiría la comparación de los resultados con el compuesto cassánico (5 $\alpha$ )-voacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**) obtenido y también de sus derivados.

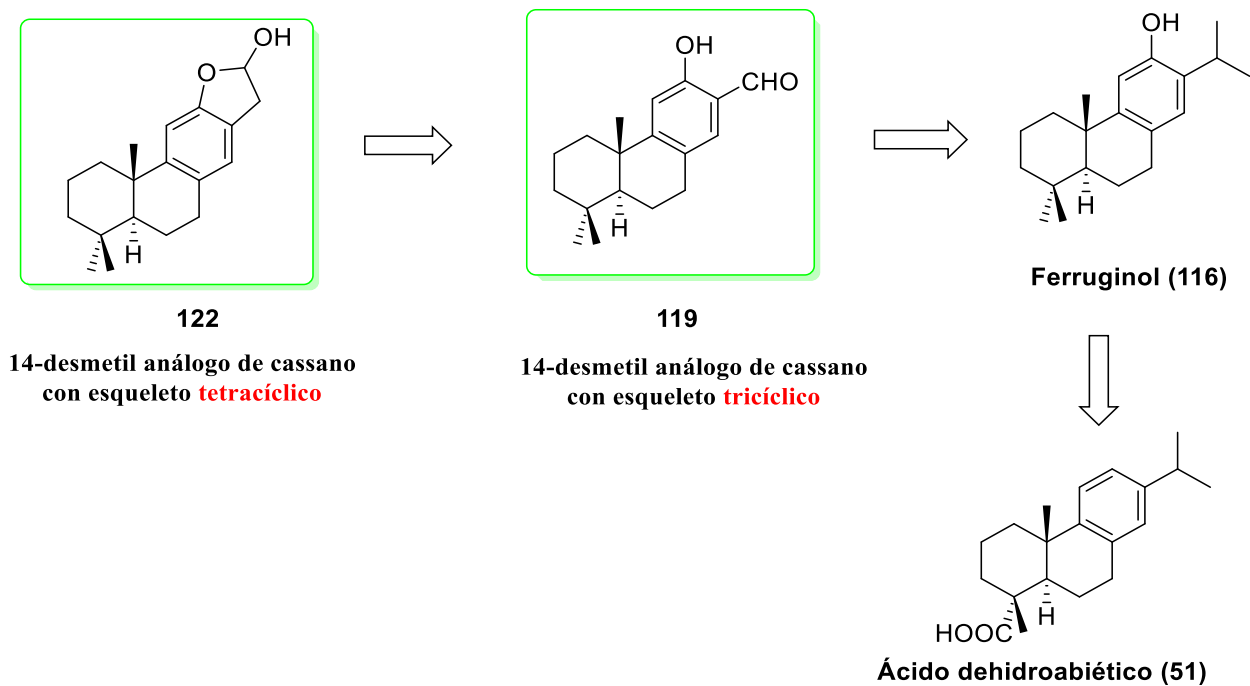
Por otro lado, dada la comprobada actividad antitumoral y antiinflamatoria que exhibieron el hidroxialdehído **97** y el lactol **108**, (valores de IC<sub>50</sub> entre 2.23 y 11.4  $\mu$ g/mL en todas las líneas celulares estudiadas - Parte II: Resultados) y siendo además perfectos modelos representativos de cassanos con esqueleto tricíclico y tetracíclico respectivamente, se centró el trabajo en esta parte, en la síntesis de los 14-desmetil análogos de estos dos compuestos.

Teniendo en cuenta que el hidroxialdehído **97** presenta la función éster en el C-18, y que el lactol **108** presenta un grupo *gem-dimetilo*, se decidió, en primer lugar, preparar el hidroxialdehído **110** a partir del diol **106**. Este compuesto presenta el grupo *gem-dimetilo* al igual que el lactol **108**, de manera que se puede comparar las actividades farmacéuticas de estos compuestos y deducir el papel que juega tanto la funcionalización en el C-14, como en el C-18.





Con esta premisa, hemos propuesto el siguiente esquema de trabajo. Primero, se prepararía el ferruginol (**116**) a partir del ácido deshidroabiético (**51**) y después, se elaborarían los compuestos **119** y **122** análogos de cassanos tricíclicos y tetracíclicos

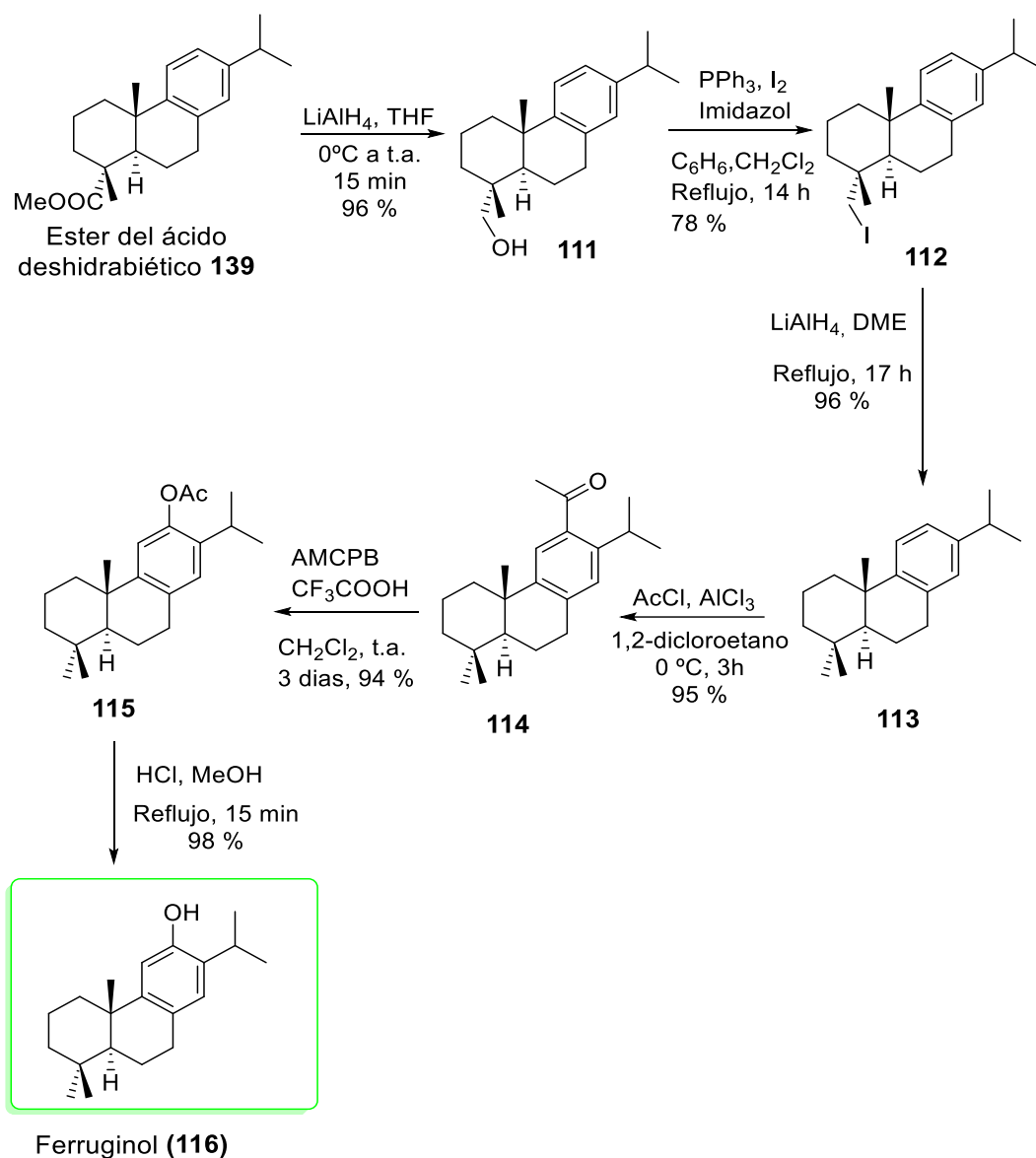


**Esquema 28.** Planteamiento de síntesis de 14-demetil análogos de cassano.

### 3.2. Síntesis de ferruginol (**116**) a partir del ácido deshidroabiético (**51**)

El ferruginol (**116**) se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito por nuestro grupo de investigación. (Esquema 28).<sup>36</sup>

<sup>36</sup> Monteagudo JJ. Síntesis de productos naturales y derivados con actividad antiparasitaria y antitumoral a partir de ácido abietico (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).

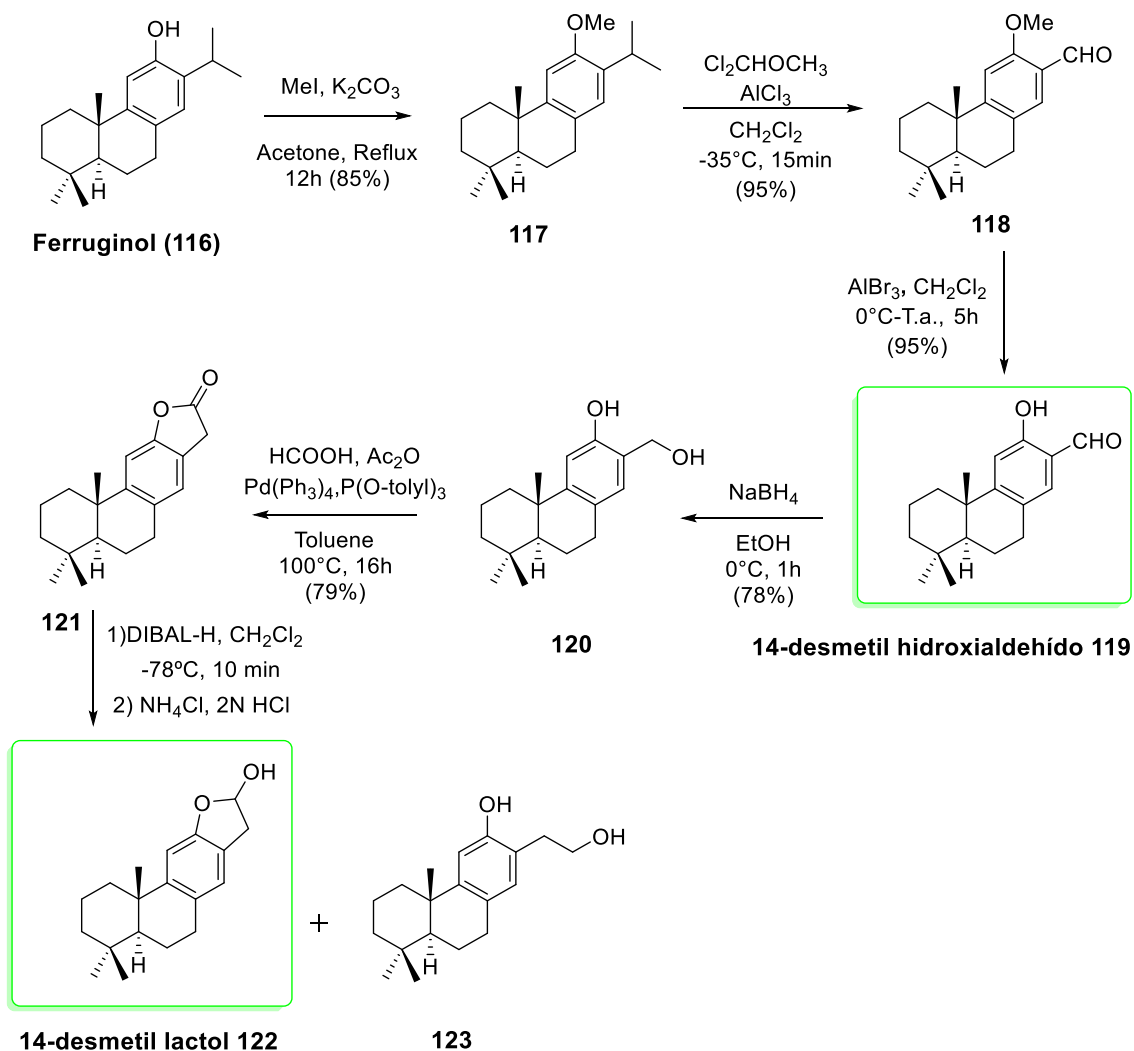


**Esquema 29.** Síntesis del ferruginol (**116**) a partir del ester del ácido deshidroabietico (**139**)

### 3.3. Formación del anillo lactol/lactónico del 14-desmetil análogos de cassanos

Una vez obtenido el ferruginol (**116**), se procedió a su transformación en los 14-desmetil análogos previamente citados. Para ello, se protegió en primer instante el ferruginol (**116**) en forma de metiléter derivado y se realizó la ipso-sustitución del grupo isopropilo con el grupo formilo y la subsiguiente reacción de desprotección. De esta

manera, se obtuvo el hidroxialdehído **119** con un rendimiento de 95%. Siguiendo la misma secuencia de reacciones que se han utilizado para la preparación de la taepenina F (**17**) a partir del hidroxialdehído **97**, se obtienen la 14-desmetil lactona **121** y el 14-desmetil lactol **122**.



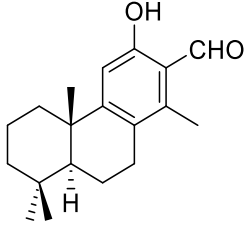
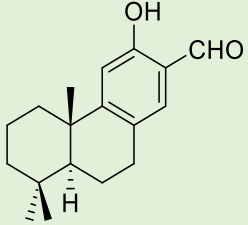
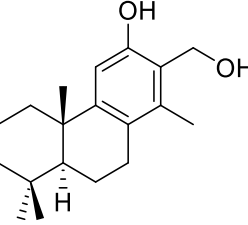
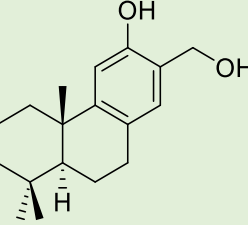
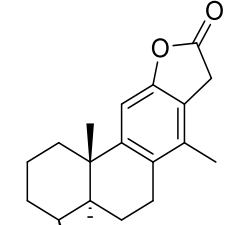
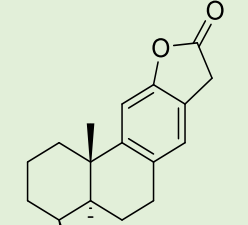
**Esquema 30.** Síntesis del 14-desmetil hidroxialdehído **119** y 14-desmetil lactol **122** a partir del ferruginol (**116**)

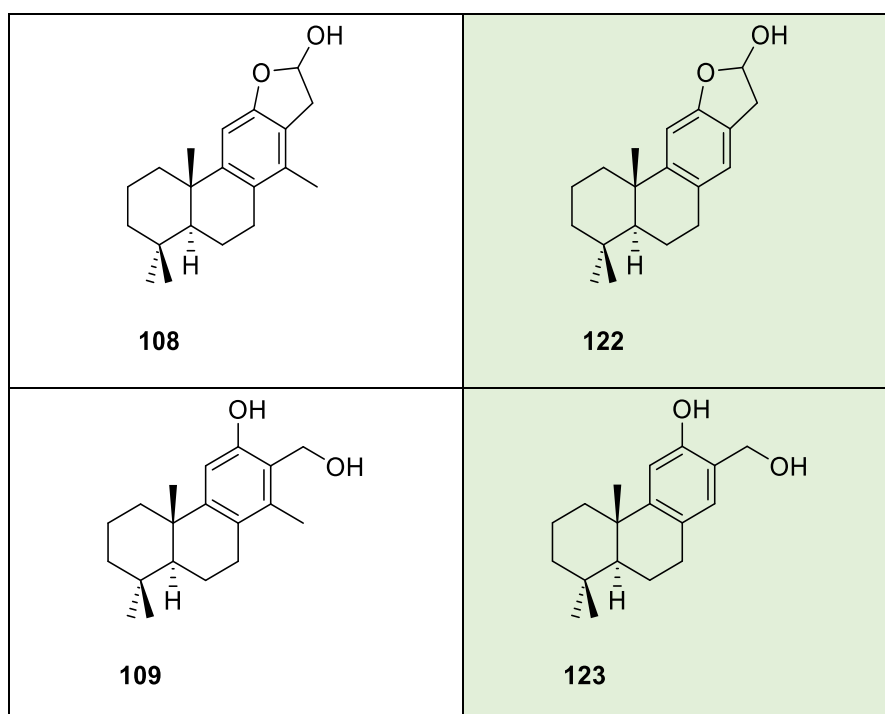
Las estructuras de los 14-desmetil análogos sintetizados, se confirmaron mediante datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , pudiéndose comparar con los compuestos metilados en C14 relacionados, debido a que se manifiestan dos principales diferencias funcionales: la presencia o no del grupo metilo en C14 y del grupo éster en C18.

Como puede apreciarse en los datos espectroscopicos, se observan algunas discrepancias en los espectros de  $^1\text{H}$  NMR y en los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  NMR de los

compuestos y sus 14-desmetil análogos, lo que se puede explicar por la presencia o la ausencia del metilo en C14.

En resumen, se ha llevado a cabo la síntesis de los 14-desmetil análogos del esqueleto cassano a partir del ácido deshidroabiético mediante su transformación en ferruginol (**116**), se sintetizaron específicamente el 14-desmetil hidroxialdehido **119** y el 14-desmetil lactol **122** análogos del hidroxialdehido **110** y del lactol **108** respectivamente, con el objetivo de comparar sus potenciales biológicos e investigar el papel del grupo metilo en la posición C14, ya que estos últimos presentan una actividad antitumoral y antiinflamatoria muy potente, como se mencionó en el segundo capítulo de esta tesis.

COMPUESTO	14 -DESMETIL ANALOGO
 <p style="text-align: center;"><b>110</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>119</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>106</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>120</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>107</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>121</b></p>



**Tabla 7.** Seleccionados diterpenos tipo cassano y sus 14-desmetil análogos.

#### 4. Síntesis de análogos bi/tricíclicos de cassanos a partir de $\beta$ -ciclocitral (124)

##### 4.1. Justificación

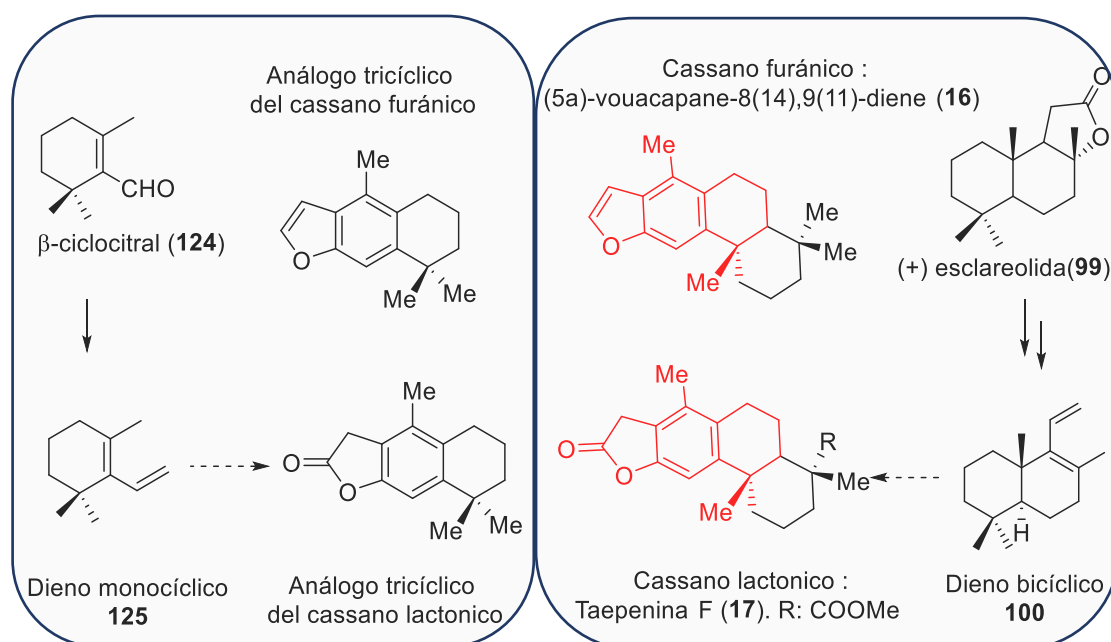
Como se ha visto con anterioridad, la importante actividad e interés biológico que presentan los cassanos, hace necesario investigar nuevos procesos más eficientes hacia éstos y nuevos compuestos relacionados y/o análogos, con objeto de obtener fácilmente moléculas potencialmente activas.

Tomamos en consideración uno de los principales procesos farmacocinéticos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo, la Absorción (entre otros: Distribución, Metabolismo, Eliminación: ADME), la cual se determina principalmente con ciertas propiedades Físico-Químicas: Peso Molecular, lipofilia, solubilidad acuosa, sus constante/s de ionización, su capacidad de atravesar por difusión las barreras biológicas que separan el sitio de administración de la sangre (que se vincula con la hidrofobicidad y el peso molecular del compuesto)...etc.<sup>37</sup>.

<sup>37</sup> Talevi A, Quiroga P, Ruiz ME. Procesos biofarmacéuticos. Series: Libros de Cátedra. 2016.

Los cassanos se forman por 5 unidades de isopreno que integran una estructura tetracíclica, compuesta por un anillo aromático y enlazado a un heterociclo de 5 miembros y una decalina. Se plantea sintetizar análogos de cassanos con 3 unidades de isopreno, que forman una estructura tricíclica análoga a los cassanos naturales. De esta manera, se pretende investigar el papel que desempeña la parte hidrofóbica de los cassanos en la actividad biológica de estos y así avanzar en el estudio de la relación estructura-actividad (**SAR**) de estos metabolitos.

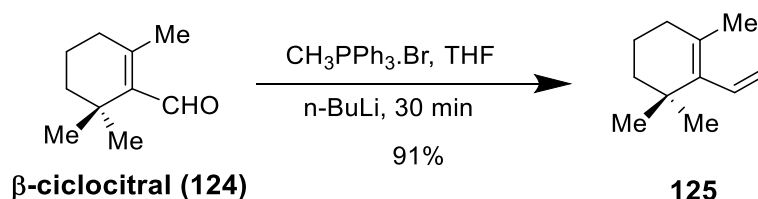
El  $\beta$ -ciclocitral (**124**) es la materia prima más adecuada para llevar a cabo nuestra propuesta. Por un lado, por su fácil transformación en el dieno **125** análogo al dieno **100**, clave en la preparación del Cassano furánico (5a)-vouacapane-8(14),9(11)-diene (**16**), y por otro lado, por su disponibilidad a nivel comercial y su precio muy económico. La estrategia planteada es similar a la utilizada para la síntesis de (5a)-vouacapane-8(14),9(11)-diene (**16**). Es decir, transformar el  $\beta$ -ciclocitral (**124**) en el dieno **125** mediante reacción de Wittig y a partir de allí, realizar los mismos pasos hasta conseguir el objetivo.



**Esquema 31.** Análogos tricíclicos de diterpenos tipo cassano.

## 4.2. Preparación del (S) -2,6-dimetilciclohex-1-eno-1-carbaldehído

El primer paso de esta ruta sintética consiste en la preparación del dieno **125** a partir del  $\beta$ -ciclocitral (**124**), utilizando la reacción de Wittig que se llevó a cabo en temperatura ambiente, utilizando el bromuro de metiltrifenilfosfonio y n-BuLi como base en THF. El dieno se obtuvo con un buen rendimiento (91%).

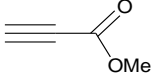
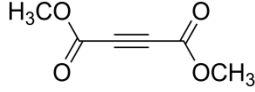
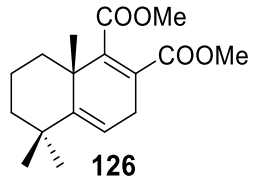
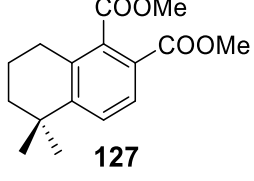
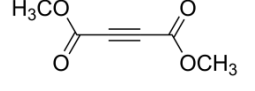
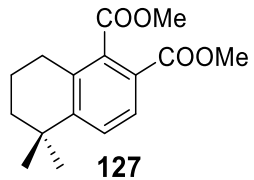
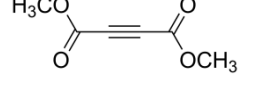
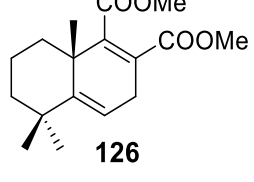


Los datos espectroscópicos de éste dieno coinciden con los ya publicados para este compuesto<sup>38</sup>

## 4.3. Estudio de la reacción de Diels-Alder

Una vez preparado el dieno **125**, y con objeto de obtener compuestos con estructuras análogas a las de cassanos, se abordó la segunda etapa de la secuencia, que consiste en el estudio de la reacción de cicloadición de Diels-Alders, usando potentes dienofilos tales como el propiolato de metilo y acetilendicarboxilato de dimetilo (DMAD). Dicha reacción se estudió bajo diferentes condiciones, variando parámetros de reacción como la temperatura, tiempo y presión. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8

<sup>38</sup> a) Scott WJ, Crisp GT, Stille JK. Palladium-Catalyzed Coupling of Vinyl Triflates with Organostannanes. A Short Synthesis of Pleraplysillin-1. *J Am Chem Soc.* 1984;106(16):4630–2. b) de Groot A, van Beek TA. Terpenoid antifeedants (Part II): The synthesis of drimane and clerodane insect antifeedants. *Recl des Trav Chim des Pays-Bas.* 1987;106(1):1–18. c) Hollinshead DM, Howell SC, Ley SV, Mahon M, Ratcliffe NM, Worthington PA. The Diels–Alder route to drimane related sesquiterpenes; synthesis of cinnamolide, polygodial, isodrimeninol, drimenin and warburganal. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 1983:1579-89..

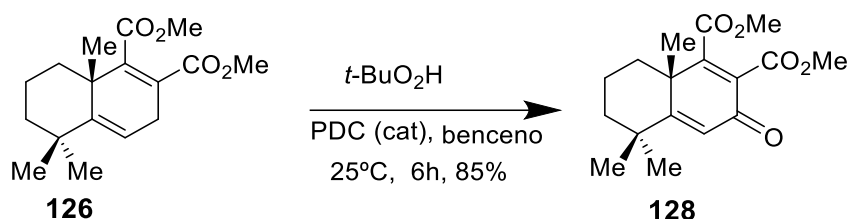
Ensayo	Reactivo	Tiempo (horas)	Disolvente Temperatura	Producto
1		24	Tolueno  Reflujo	No reacción
2	  <b>DMAD</b>	24	Tolueno (T°= 110 °C)  Reflujo	 <b>126</b>   <b>127</b>  (3:1)
3	  <b>DMAD</b>	24	Xileno (T°= 140 °C)  Reflujo	 <b>127</b>  (1:5)
4	  <b>DMAD</b>		Sin disolvente En un tubo cerrado  T°= 110°C	 <b>126</b>

**Tabla 8.** Ensayos de la reacción de Diels-Alder sobre el dieno (**125**)



#### 4.4. Oxidación del aducto 126

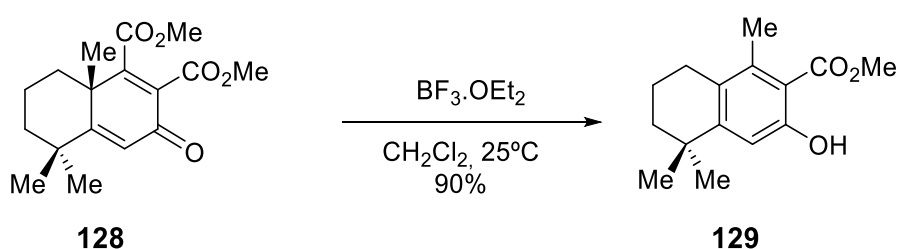
Al igual que la oxidación del cicloaducto **102**, la oxidación del aducto **126** se llevó a cabo con PDC en presencia de hidroperóxido de tercio-butilo en benceno. Tras 5 horas de reacción a temperatura ambiente, se obtuvo la deseada cetona **128** con un rendimiento del 80%.



La estructura de la dienona obtenida **128**, fue identificada mediante datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.5. Transposición del grupo metilo angular de la dienona 128

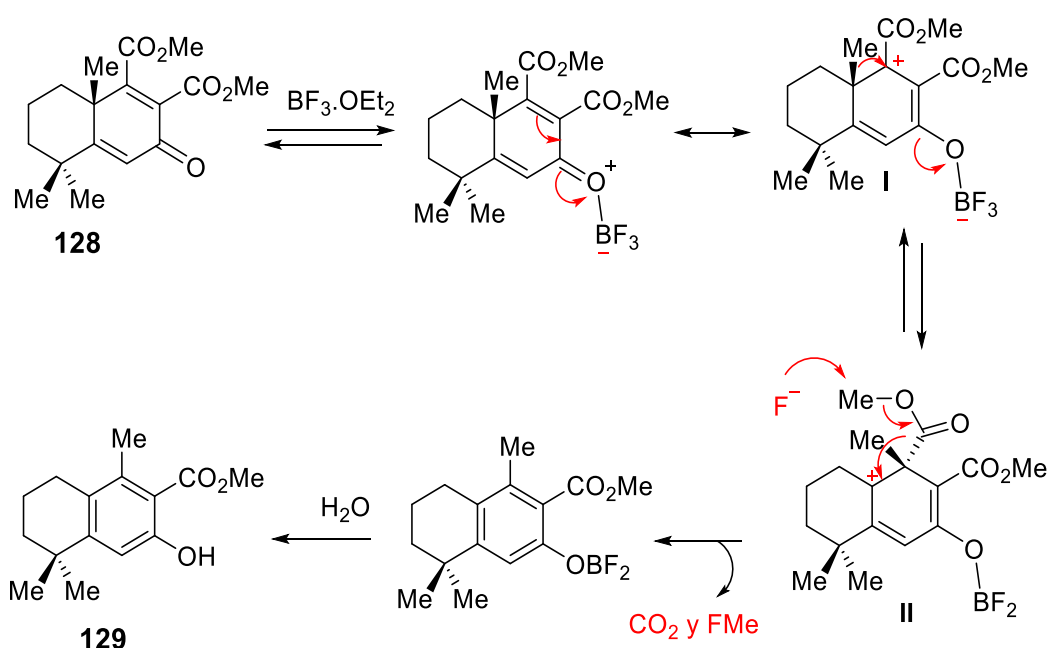
A continuación, se realizó el reordenamiento de la dienona **128** mediante las mismas condiciones descritas para la cetona **103**. Tras 13 horas de reacción en presencia de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en diclorometano a temperatura ambiente, se obtiene el fenoléster **129** con un rendimiento del 90%.



La estructura del fenol **129** obtenido se caracterizó igualmente con técnicas espectroscópicas de RMN tanto de protones como de  $^{13}\text{C}$ . En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa un claro desapantallamiento de una señal de un grupo metilo que sale a 2.40 ppm, atribuida al metilo sobre anillo aromático. Otro dato importante que ratifica la aromatización del anillo B, es el desapantallamiento que sufre el proton olefínico, ya que pasa de 6.3 ppm a 6.90 ppm, indicativo de que la estructura se ha aromatizado. El espectro de  $^{13}\text{C}$ , que muestra 7 señales atribuidas a un metilo aromático y 6 carbonos cuaternarios

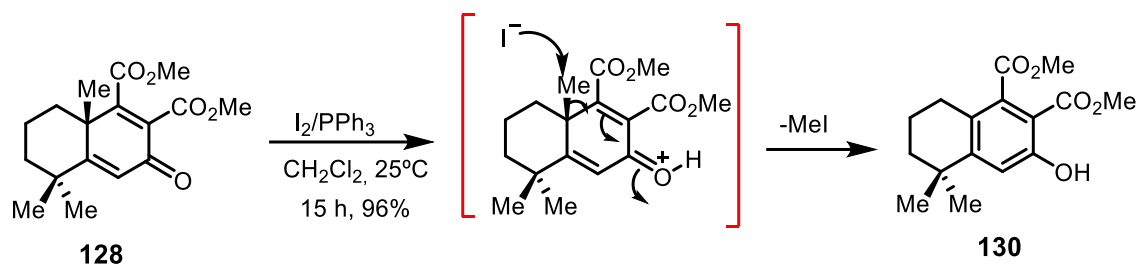
aromáticos; 112.9 (CH), 127.2 (C), 138.7(C), 153.3 (C), 158.6 (C), y 171.8, confirma la estructura propuesta.

La formación de este fenol **129** puede explicarse mediante un mecanismo similar al de la reacción del reordenamiento dienona-fenol, con descarboxilación simultánea, previamente postulado. (Esquema 32). Como ya se ha comentado con anterioridad, el ácido de Lewis, en primer instante, se coordina con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo cetónica, provocando así la activación del C-9. Éste a su vez, provoca la migración del grupo metilo desde el C-10 hacia el C-9 con simultánea pérdida de CO<sub>2</sub> y metanol, dando lugar finalmente al fenol **129**.



**Esquema 32.** Mecanismo propuesto para la formación del fenol **129**.

Por otra parte, y de forma análoga a la reacción de **103** con el sistema I<sub>2</sub>/PPh<sub>3</sub>, el tratamiento de **128** bajo estas mismas condiciones dio lugar al fenoldiéster **130** con un rendimiento del 95%.

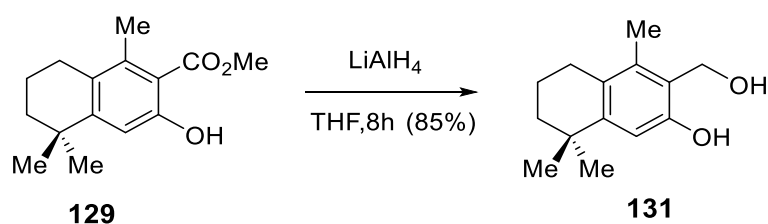


Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  del fenol **130**, indican la aparición del protón fenólico a 10.6 ppm y la presencia de los dos grupos metilos a 3.91 y 3.92, que indican la presencia de los dos grupos ésteres en la molécula. El espectro de  $^{13}\text{C}$  corrobora la estructura del fenol **130**.

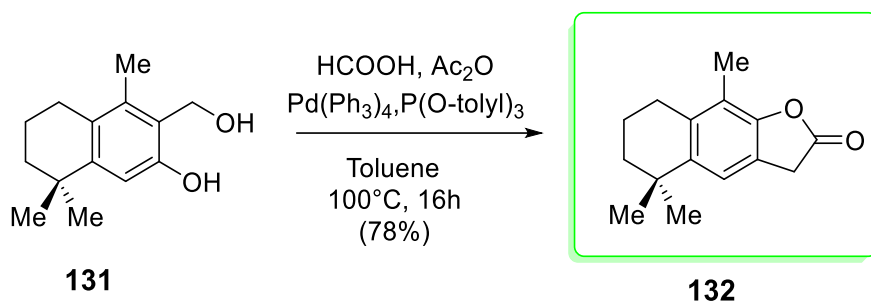
El mecanismo de esta reacción es similar, en parte, al anterior. Sin embargo en este caso, debido a la alta nucleofilia del ión yoduro y su tamaño más grande, se produce el ataque al grupo metilo, menos impedido que el metoxilo del grupo éster.

#### 4.6. Elaboración del anillo $\gamma$ -lactónico de los análogos bi/tricíclicos de cassanos

El siguiente paso del planteamiento propuesto para la síntesis de análogos de cassanos consiste es la reducción del grupo éster. Esta reacción se llevó a cabo mediante tratamiento del fenol **129** con  $\text{LiAlH}_4$  en THF a temperatura ambiente.



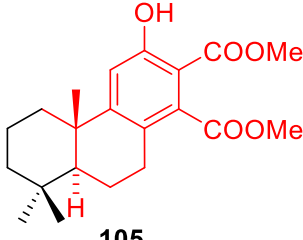
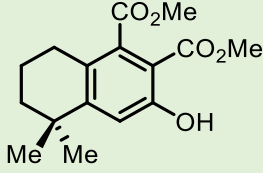
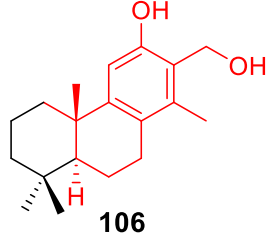
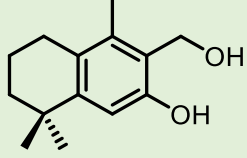
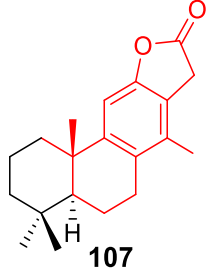
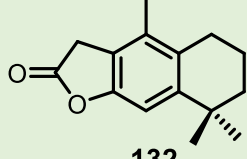
Una vez obtenido el diol **131** se procedió como se planteó previamente, a la inserción del monóxido de carbono a través de una carbonilación catalizada por Paladio, dando lugar a la lactona **132** con un rendimiento de 78%.



La lactona **132** es el análogo monoterpénico del (5a)-vouacapane-8(14),9(11)-dieno (**16**). La estructura de la lactona **132** se confirmó mediante los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ .

En resumen, se ha llevado a cabo la síntesis de análogos monoterpénicos de los siguientes compuestos, a partir del  $\beta$ -ciclocitral, que se recogen en la siguiente tabla.

COMPUESTO	ANALOGO MONOTERPENICO
<p><b>102</b></p>	<p><b>126</b></p>
<p><b>101</b></p>	<p><b>127</b></p>
<p><b>103</b></p>	<p><b>128</b></p>
<p><b>104</b></p>	<p><b>129</b></p>

 <p><b>105</b></p>	 <p><b>130</b></p>
 <p><b>106</b></p>	 <p><b>131</b></p>
 <p><b>107</b></p>	 <p><b>132</b></p>

**Tabla 9.** Productos de la vía de síntesis de (5 $\alpha$ )-voacapano-8 (14) - 9 (11) -dieno (16) y sus análogos bi/ticíclicos

# EXPERIMENTAL

## 1. Introducción

### 1.1. Instrumentación.

**Rotación óptica específica ( $[\alpha]_D$ ).** Los valores de rotación óptica se han obtenido empleando un polarímetro PERKIN-ELMER modelo 341, con una lámpara de sodio como fuente (línea D,  $\lambda = 589$  nm). Las células usadas son de 1 dm de longitud, utilizando  $\text{CHCl}_3$  como disolvente. La concentración de las muestras se expresa en mg/mL.

**Espectroscopia infrarroja (IR).** Los espectros de IR se realizaron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer UATR Spectrum Two FTIR, aplicando el producto sobre un cristal de NaCl como una película líquida o en pastillas de KBr, según la muestra. Los valores recogidos de los espectros de IR se expresan en número de ondas  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ), indicándose solamente las bandas de absorción más significativas.

**Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).** Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se han registrado en espectrómetros. Varían a 600, 500 y 400 MHz, y 150, 125 y 100 MHz respectivamente, utilizando TMS como referencia interna y  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  como disolventes. El  $\text{CDCl}_3$  se trata con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  para eliminar las trazas de acidez. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz).

En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN los desplazamientos químicos se referenciaron con la señal del  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.26$  ppm). La multiplicidad de las señales se indica mediante las abreviaturas correspondientes (s: singlete, d: doblete, t: triplete, q: cuádruplete, hept: heptete, dd: doble doblete, ddd: doble doblete, m: múltiplete), utilizando “br” cuando la señal es ancha. Los desplazamientos químicos en los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN se ajustaron respecto del pico central del  $\text{CDCl}_3$  a ( $\delta = 77.0$  ppm). Las señales se asignaron gracias a la utilización de los experimentos DEPT y la asignación de señales se realizó en correlación con los datos espectroscópicos de moléculas similares ya confirmados mediante experiencias bidimensionales. Las experiencias bidimensionales se realizaron en el espectrómetro de 500 MHz, utilizando las secuencias de pulsos HSQC, COSY y NOESY.

**Espectrometría de masas (EM).** Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en un espectrómetro con analizador Q-TOF e ionización ESI+.

**Puntos de fusión.** Se determinan con un aparato Kofler hot stage

## 1.2. Cromatografía.

**Cromatografía en capa fina (CCF).** Se utilizan placas de gel de sílice MERCK DC-Aufolien (Kieselger 60 F254) con soporte de aluminio en capas de 0.25 mm de espesor. Los eluyentes empleados son mezclas de hexano y acetato de etilo en distintas proporciones. La visualización de las manchas se consigue por inmersión en una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico y posterior calentamiento, por exposición de la placa a luz ultravioleta de 254 nm, o por revelado en una cámara con yodo.

**Cromatografía en columna de gel de sílice.** Se utiliza gel de sílice MERCK 60 (230-400 mallas). La elución se realiza con mezclas de polaridad creciente de hexano (Hx) y acetato de etilo (AcOEt), siguiendo el curso del proceso cromatográfico mediante CCF y pesada de fracciones.

## 1.3. Disolventes.

Todas las reacciones descritas se llevaron a cabo en material de vidrio (matraces redondos, salvo que se indique lo contrario) secado en estufa a 110°C, bajo una atmósfera inerte de argón y usando disolventes anhidros. La purificación de los disolventes empleados en los trabajos de síntesis realizados se llevó a cabo según procedimientos descritos en la literatura <sup>39</sup>. Asimismo, se destilaron CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH sobre hidruro cálcico y THF, benceno y tolueno sobre sodio y benzofenona.

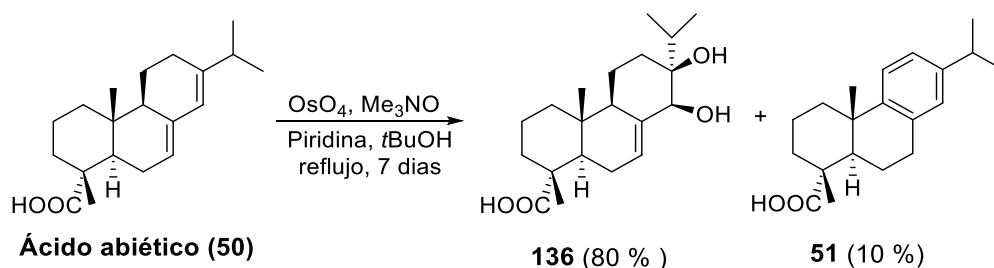
---

<sup>39</sup> Perrin, D. D. WLF Armarego in Purification of Laboratory Chemicals. (1988): 123.



## 2. Procedimientos experimentales hacia la síntesis la Taepenina F (17) a partir del (-)-abietico (50)

### 2.1. Dihidroxilación del ácido (-)-abietico (50).



A una disolución de ácido abietico (**50**) puro (20 g, 66.12 mmoles) en *tert*-butanol (140 mL) desoxigenado se añade N-óxido de trimetilamina dihidratada (10.5 g, 82.09 mmoles) y piridina (2 mL), el matraz se resguarda de la luz y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min bajo atmósfera de argón. Tras ese tiempo se añade una disolución acuosa de tetróxido de osmio al 0.2 % (24 mL) y la mezcla se calienta a reflujo durante 7 días. Trascurrido ese tiempo y tras comprobar por CCF que no queda material de partida, se elimina el disolvente a vacío obteniendo un crudo que se diluye con éter (120 mL) se lava con una disolución de ácido clorhídrico 2 N (2 x 30 mL), agua (2 x 30 mL) y salmuera (2 x 30 mL), se seca sobre sulfato sódico anhidro se elimina el disolvente a vacío obteniendo un crudo que se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice obteniendo 17.80 g del diol **136** (80 %) (E: H, 20 %) como un aceite amarillo y 1.99 g del ácido dehidroabietico (**51**) (10 %) (E: H 5 %) como un sólido incoloro.

#### Ácido 13 $\beta$ , 14 $\beta$ -dihidroxiabieta-7-en-18-oico, (**136**).

Pf = 156-157 ° C.

$[\alpha]_D^{25} = -3.75$  (c = 0.8, CHCl<sub>3</sub>).

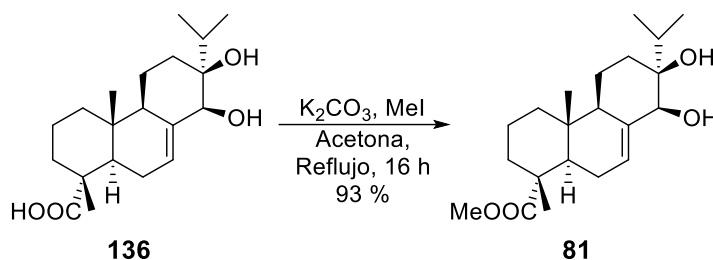
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.83 (s, 3 H), 0.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H), 0.93 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H), 1.32 (s, 3 H), 1.43 (dd,  $J = 11.6, 2.9$  Hz, 1 H), 1.91 (m, 1 H), 2.17 (h,  $J = 6.9$  Hz, 1 H), 4.02 (s a, 1 H), 5.88 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 36.8 (C-1), 19.2 (C-2)\*, 39.1 (C-3), 46.2 (C-4), 51.2 (C-5), 26.5 (C-6), 119.7 (C-7), 137.8 (C-8), 44.5 (C-9), 35.2 (C-10), 19.2 (C-

11)\*, 24.9 (C-12), 76.4 (C-13), 73.1 (C-14), 33.1 (C-15), 17.8 (C-16)\*\*, 18.0 (C-17)\*\*, 183.9 (C-18), 15.1.(C-19), 19.1 (C-20).

**IR (film):** 3441, 2924, 1693, 1462, 1023, 801  $\text{cm}^{-1}$ .

## 2.2. Esterificación del ácido **136**.



A una disolución de ácido **136** (17 g, 50.59 mmoles) en acetona (100 mL), se añade carbonato potásico (10.49 g, 75.89 mmoles) y yoduro de metilo (12 mL, 156 mmoles), calentando la mezcla a reflujo durante 14 horas. Tras comprobar por CCF la transformación completa de **136**, se evapora el disolvente y se extrae con éter (120 mL) y agua (40 mL). La fase orgánica se lava con agua (3 x 30 mL), salmuera (3 x 30 mL), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, eliminando el disolvente a vacío obteniéndose 16.47 g de **81** (93 %) como un sólido blanco.

**13 $\beta$ , 14 $\beta$ -Dihidroxiabieta-7-en-18-oato de metilo, (81).**

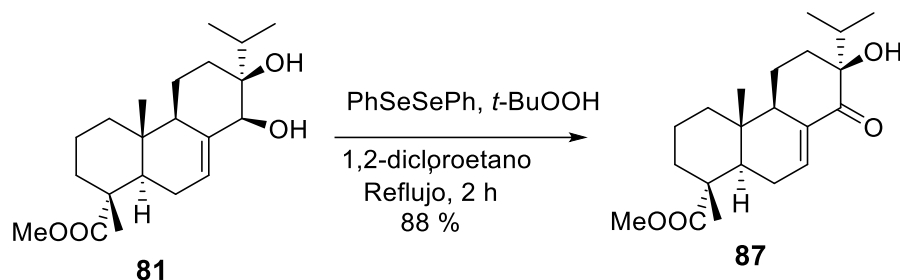
**Pf** = 107 ° C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  = - 0.57 (c = 0.7,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H}$  RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.85 (s, 3 H), 0.89 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H), 0.92 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H), 1.24 (s, 3 H), 1.91 (m, 1 H), 2.17 (h,  $J = 6.9$  Hz, 1 H), 3.61 (s, 3 H), 3.93 (s a, 1 H), 5.85 (bs, 1 H).

**$^{13}\text{C}$  RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 36.9 (C-1), 19.2 (C-2), 39.1 (C-3), 46.5 (C-4), 51.3 (C-5), 26.4 (C-6), 119.9 (C-7), 137.9 (C-8), 44.7 (C-9), 35.2 (C-10), 19.0 (C-11), 25.0 (C-12), 77.1 (C-13), 73.2 (C-14), 33.1 (C-15), 15.5 (C-16), 16.4 (C-17), 179.2 (C-18), 15.9 (C-19), 17.5 (C-20), 51.9 ( $\text{COOCH}_3$ ).

**IR (film):** 3362, 2934, 1722, 1461, 1242, 948, 757  $\text{cm}^{-1}$ .

2.3. Oxidación del alcohol alílico **81** con el sistema PhSeSePh /*t*-BuOOH.

Sobre una disolución del dioléster **81** (8.48 g, 24.2 mmol) en 1,2-dicloroetano (90 mL) bajo atmósfera de argón, se añade el difenil diselenido (8.6 g, 27.6 mmol) and *t*-BuOOH (7.3 mL, 36.4 mmol, 5 M in decano) y la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 2h. Tras este tiempo se comprueba por CCF la completa consumición del material de partida, se elimina el disolvente a presión reducida y se purifica por cromatografía flash (20% AcOEt/hexano) obteniendo **87** (7.44 g, 88%) como un aceite incoloro.

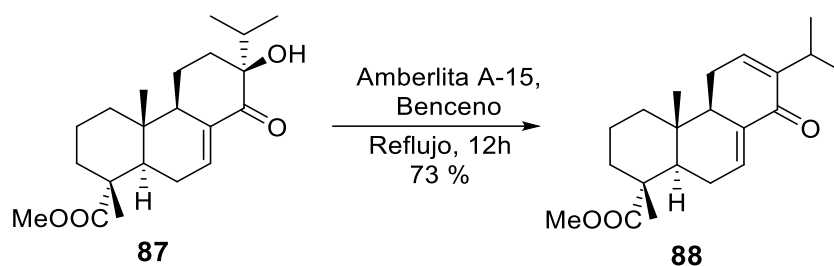
*(1R,4aR,7S,10aR)*-methyl 7-hydroxy-7-isopropyl-1,4a-dimethyl-8-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-dodecahydrophenanthrene-1-carboxylate (**87**).

$[\alpha]_D^{25} = +16.9$  ( $c = 0.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.66 (s, 3 H), 0.97 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H), 1.03 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H), 1.15 (s, 3 H), 1.51-1.96 (m, 7 H), 2.93 (s 1 H), 3.63 (s, 3 H), 6.90 (bs, 1 H).

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 36.5 (C-1), 18.0 (C-2), 38.0 (C-3), 45.9 (C-4), 43.9 (C-5), 26.2 (C-6), 137.6 (C-7), 135.1 (C-8), 50.8 (C-9), 34.6 (C-10), 18.3 (C-11), 32.7 (C-12), 77.9 (C-13), 203.5 (C-14), 35.1 (C-15), 16.3 (C-16)\*, 16.4 (C-17)\*, 178.1 (C-18), 26.3 (C-19), 13.6 (C-20), 51.7 ( $\text{COOCH}_3$ ).

**IR (film)**: 3500, 2951, 1714, 1652, 1631, 1462, 1386, 1246, 1187  $\text{cm}^{-1}$ .

2.4. Deshidratación del alcohol **87**.

A una disolución de la hidroxilcetona **87** (7.44 g, 21.2 mmol) disuelto en benceno seco (80 mL), bajo atmósfera de argón se adiciona Amberlyst -A15 (3 g) y la mezcla se calienta a reflujo durante 12 h. Tras comprobar por CCF la completa consumición de **87**, se elimina el disolvente a vacío obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (15 % E: H) para dar lugar a **88** (5.12 g, 73%) como un aceite incoloro.

*(1R,4aR,10aR)-methyl 7-isopropyl-1,4a-dimethyl-8-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,8,10,10a-decahydrophenanthrene-1-carboxylate (88).*

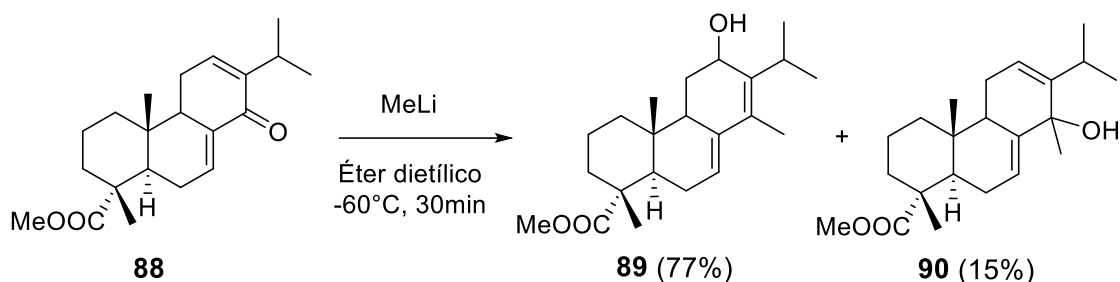
$[\alpha]_D^{25} = -0.66$  (c = 0.91, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.86 (s, 3 H), 0.97 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.03 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.24 (s, 3 H), 2.90 (h, *J* = 6.9 Hz, 1 H), 3.63 (s, 3 H), 6.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.00 (s b, 1 H).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 36.9 (C-1), 18.2 (C-2), 38.3 (C-3), 46.1 (C-4), 43.6 (C-5), 26.0 (Card-6g), 135.7 (C-7), 135.0 (C-8), 49.6 (C-9), 37.0 (C-10), 23.1 (C-11), 140.6 (C-12), 145.7 (C-13), 186.3 (C-14), 26.7 (C-15), 22.3 (C-16)\*, 23.1 (C-17)\*, 178.5 (C-18), 14.9 (C-19), 16.9 (C-20), 52.0 (COOCH<sub>3</sub>).

IR (film):: 2870, 1724, 1667, 1612, 1460, 1424, 1385, 1302, 1005, 911, 827, 756 cm<sup>-1</sup>.

Los datos espectroscópicos de los compuestos **87** y **88** coinciden con los descritos en literatura.<sup>1</sup>

2.5. Reacción de la dienona **88** con el MeLi

A una solución de la dienona **88** (3,20 g, 9,68 mmol) en éter dietílico anhidro (80 ml), enfriada a  $-60^\circ\text{C}$  y bajo atmósfera de argón, se le añade lentamente metilítio (3,55 ml, 10,65 mmol, 3,1 M en dietoximetano). La mezcla de reacción se agita a  $-60^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, momento en el cual la TLC no muestra material de partida. Luego, se añade lentamente agua (20 ml), la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 minutos y las fases se agitan y se separan. La capa orgánica se lava con agua (30 ml) y salmuera (30 ml), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentra a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (5% AcOEt / hexano) para producir una mezcla de isómeros del dieno **89** (2,58 g, 77%) y dieno **90** (0,50 g, 15%) ambos como sirupos incoloros.

*(1R,4aR,10aR)-methyl 6-hydroxy-7-isopropyl-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,10,10a-decahydrophenanthrene-1-carboxylate (89).*

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -94.5$  (c 1.3,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.79 (s, 3H), 1.02 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.14 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.26 – 1.31 (m, 2H), 1.54 – 1.66 (m, 4H), 1.79 (s, 3H), 1.81 – 1.90 (m, 3H), 2.08 – 2.15 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 2.97 (hept,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 4.38 (m, 1H), 5.77 (m, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 13.6 ( $\text{CH}_3$ ), 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 16.9 ( $\text{CH}_3$ ), 18.2 ( $\text{CH}_2$ ), 21.5 ( $\text{CH}_3$ ), 22.0 ( $\text{CH}_3$ ), 26.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 (CH), 31.0 ( $\text{CH}_2$ ), 34.4 (C), 37.2 ( $\text{CH}_2$ ), 38.1 ( $\text{CH}_2$ ), 44.0 (CH), 44.6 (CH), 46.5 (C), 52.0 ( $\text{CH}_3$ ), 64.2 (CH), 121.3 (CH), 129.1 (C), 135.6 (C), 139.3 (C), 179.1 (C).

**IR (film):** 3419, 2926, 1726.5, 1459, 1433, 1385, 1243, 1151, 1104, 1144, 1024, 771

$\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS** (ESI)  $m/z$ : calcd for  $C_{22}H_{34}O_3 Na$  ( $M+Na^+$ ) 369.2406, found: 369.2397

**(1R,4aR,10aR)-methyl 8-hydroxy-7-isopropyl-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,4b,5,8,10,10a-decahydrophenanthrene-1-carboxylate (90).**

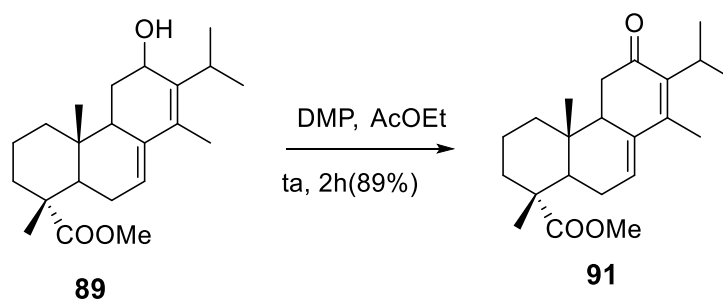
**$^1H$  NMR** ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): Common signals: 0.89 (dd,  $J = 10.3, 6.8$  Hz, 12H), 1.35 – 1.78 (m, 14H), 1.88 (h,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.25 – 2.41 (m, 2H), 2.59 – 2.69 (m, 4H), 2.72 – 2.78 (m, 4H), 3.66 (s, 6H); signals assignable to the major isomer: 0.75 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 5.33 (m, 1H), 6.85 (m, 1H); signals assignable to the minor isomer: 0.80 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 5.56 (m, 1H), 6.22 (m, 1H).

**$^{13}C$  NMR** ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): Common signals and signals assignable to the major isomer: 13.50 ( $CH_3$ ), 16.90 ( $CH_3$ ), 17.36 ( $CH_3$ ), 17.65 ( $CH_3$ ), 18.03 ( $CH_2$ ), 21.83 ( $CH_2$ ), 25.96 ( $CH_3$ ), 34.84 ( $CH_2$ ), 35.84 (C), 36.28 ( $CH_2$ ), 37.06 ( $CH_2$ ), 37.10 (CH), 46.17 (C), 50.72 (CH), 52.13 ( $CH_3$ ), 60.69 (CH), 77.92 (C), 125.30 (CH), 130.11 (CH), 134.82 (C), 142.19 (C), 179.01 (C); señales correspondientes al isomero minoritario: 14.28 ( $CH_3$ ), 18.41( $CH_2$ ), 18.74 ( $CH_3$ ), 19.62 ( $CH_2$ ), 24.36 ( $CH_3$ ), 24.45 ( $CH_2$ ), 26.18 ( $CH_3$ ), 33.33 ( $CH_2$ ), 35.78 ( $CH_2$ ), 37.93 (C), 46.52 (C), 47.50 (CH), 49.63 (CH), 72.22 (C), 125.05 (CH), 126.36 (CH), 132.66 (C), 143.44 (C), 178.79 (C).

**IR (film)**: 3531, 2947, 2869, 1726, 1457, 1384, 1242, 1150  $cm^{-1}$ .

**HRMS** (ESI)  $m/z$ : calcd for  $C_{22}H_{34}O_3 Na$  ( $M+Na^+$ ) 369.2406, found: 369.2403

## 2.6. Oxidación del dienol 89



A una solución de dienol **89** (2,58 g, 7,44 mmol) en acetato de etilo (80 ml) a temperatura ambiente, se le añade Dess-Martin Periodinane (3,80 g, 8,94 mmol). Después de 2 horas de reacción, se comprueba mediante CCF la desaparición total del material de partida. Luego, la reacción se detiene con agua (10 mL) y la mezcla se lava con una solución sat. acuosa de NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10%) (2 x 20 ml) y salmuera (20 ml). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía flash sobre gel de sílice (5% AcOEt / Hexano) para obtener la dienona **91** (2,28 g, 89%) como un sólido amarillo.

*(1R,4aR,10aR)-methyl 7-isopropyl-1,4a,8-trimethyl-6-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,6,10,10a-decahydrophenanthrene-1-carboxylate (91).*

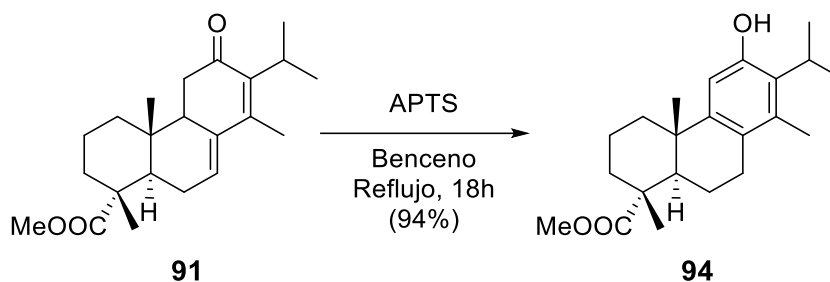
$[\alpha]_D^{25} = -44.5$  (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.85 (s, 3H), 1.15 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.22 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.48 – 1.83 (m, 7H), 1.94 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 2.09 – 2.23 (m, 2H), 2.32 – 2.46 (m, 2H), 3.08 (hept, J = 7.0 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 6.20 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 14.7 (CH<sub>3</sub>), 15.7 (CH<sub>3</sub>), 17.1 (CH<sub>3</sub>), 18.0 (CH<sub>2</sub>), 20.3 (CH<sub>3</sub>), 21.5 (CH<sub>3</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 28.1 (CH), 35.1 (C), 37.1 (CH<sub>2</sub>), 38.0 (CH<sub>2</sub>), 38.7 (CH<sub>2</sub>), 43.4 (CH), 46.2 (C), 49.6 (CH), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 128.4 (CH), 135.4 (C), 139.9 (C), 147.2 (C), 178.9 (C), 200.0 (C).

IR (film): 2926, 1727, 1666, 1387, 1247, 1148, 772 cm<sup>-1</sup>.

HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup>) 345.2430, found: 345.2431

2.7. Síntesis del fenol **94**

A una solución de dienona **91** (2,28 g, 6,62 mmol) en benceno anhidro (60 ml) se le añade ácido *p*-toluenosulfónico (2,52 g, 13,24 mmol) y la mezcla de reacción se agita a reflujo durante 18 h, momento en el cual CCF muestra la desaparición del producto de partida. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo obtenido se filtra sobre gel de sílice (10% AcOEt/hexano) para rendir el fenol **94** (2,14 g, 94%) como un sólido blanco.

*(1R,4aS,10aR)*-methyl 6-hydroxy-7-isopropyl-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (**94**).

Pf 197-200 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 52.5$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

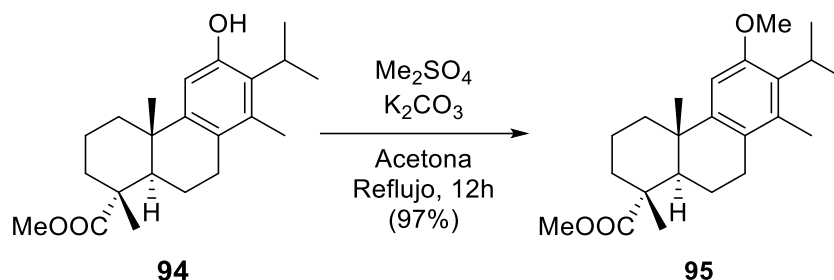
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.21 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.35 (t, J = 7.0 Hz, 6H), 1.41 – 1.51 (m, 2H), 1.60 – 1.85 (m, 5H), 2.15 (s, 3H), 2.17 – 2.23 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.71 (m, 1H), 3.39 (hept, J = 7.0 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 4.56 (s, 1H), 6.50 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 15.7 (CH<sub>3</sub>), 16.6 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>2</sub>), 20.9 (CH<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (CH<sub>3</sub>), 28.0 (CH), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 36.6 (CH<sub>2</sub>), 37.2 (C), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 44.2 (CH), 47.7 (C), 52.1 (CH<sub>3</sub>), 110.0 (CH), 125.9 (C), 129.9 (C), 135.2 (C), 148.1 (C), 152.5 (C), 179.4 (C).

IR (film): 3424, 2931, 1694, 1297, 1254, 1134 cm<sup>-1</sup>

HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup>) 345.2430, found: 345.2422



2.8. Protección del fenol **94**

Sobre una solución de fenol **94** (2,14 g, 6,21 mmol) en acetona (40 ml) se añaden  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,29 g, 9,32 mmol) y  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  (0,88 ml, 9,32 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 12 h, momento en el que la CCF no indica la presencia del material de partida. Luego, el disolvente se evapora a presión reducida, el residuo se diluye con éter (30 ml) y se lava con agua (3 x 15 ml) y salmuera (15 ml). La fase orgánica se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evapora al vacío para proporcionar un producto bruto, que se purifica por cromatografía flash sobre gel de sílice (5% AcOEt / hexano), dando lugar al compuesto **95** (2,16 g, 97%) como un sirupo incoloro.

*(1R,4aS,10aR)-methyl 7-isopropyl-6-methoxy-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (95).*

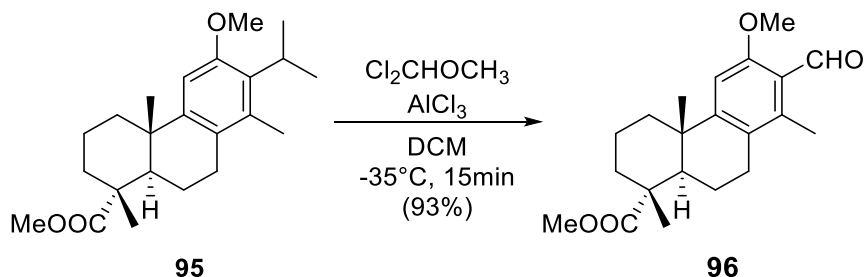
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +51.2$  (c 0.3,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.26 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.32 (dd,  $J = 7.1, 5.3$  Hz, 6H), 1.45 – 1.56 (m, 2H), 1.61 – 1.87 (m, 5H), 2.17 (s, 3H), 2.24 (m, 1H), 2.28 (m, 1H), 2.58 – 2.78 (m, 2H), 3.41 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 6.69 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 15.70 ( $\text{CH}_3$ ), 16.62 ( $\text{CH}_3$ ), 18.85 ( $\text{CH}_2$ ), 21.03 ( $\text{CH}_3$ ), 21.15 ( $\text{CH}_3$ ), 22.19 ( $\text{CH}_2$ ), 25.18 (CH), 25.19 ( $\text{CH}_3$ ), 28.77 ( $\text{CH}_2$ ), 36.63 ( $\text{CH}_2$ ), 37.57 (C), 38.57 ( $\text{CH}_2$ ), 44.36 (CH), 47.78 (C), 52.01 ( $\text{CH}_3$ ), 55.54 ( $\text{CH}_3$ ), 105.78 (CH), 125.96 (C), 132.34 (C), 134.80 (C), 147.62 (C), 156.94 (C), 179.26 (C).

**IR (film):** 2930, 1726, 1456, 1246, 1133, 1103  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{O}_3$  (M+H<sup>+</sup>) 359.2586, found: 359.2581

2.9. Desisopropilacion del O-metilo **95**

A una solución del compuesto **95** (2,16 g, 6,02 mmol) en diclorometano anhidro (60 ml) enfriado a  $-35^\circ\text{C}$  y bajo atmósfera de argón, se le añade diclorometil metil éter (1,6 ml, 18,07 mmol). A esta mezcla vigorosamente agitada, se le agrega  $\text{AlCl}_3$  (2,45 g, 18,07 mmol) en pequeñas porciones durante un período de 5 minutos. La mezcla de reacción se agita a  $-35^\circ\text{C}$  durante 15 minutos más, momento en el que la CCF no indica presencia de material de partida. La mezcla se vierte lentamente en agua-hielo y se extrae con acetato de etilo (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua (3 x 40 ml) y salmuera (40 ml), se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentran a presión reducida. El producto bruto obtenido, se purifica por cromatografía ultrarápida sobre gel de sílice (5% AcOEt / hexano) para rendir el aldehído **96** (1,93 g, 93%) como un sirupo incoloro.

*(1R,4aS)-methyl7-formyl-6-methoxy-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (96).*

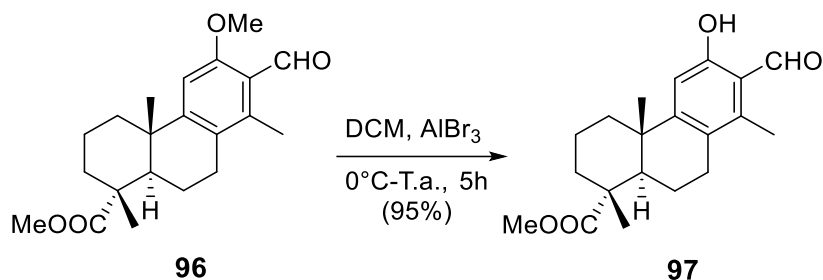
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +31.8$  (c 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.24 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.47 – 1.56 (m, 2H), 1.63 – 1.84 (m, 5H), 2.17 (dd,  $J = 12.7, 2.1$  Hz, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.63 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.76 (s, 1H), 10.58 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 15.5 ( $\text{CH}_3$ ), 16.6 ( $\text{CH}_3$ ), 18.6 ( $\text{CH}_2$ ), 21.7 ( $\text{CH}_2$ ), 24.8 ( $\text{CH}_3$ ), 27.5 ( $\text{CH}_2$ ), 36.5 ( $\text{CH}_2$ ), 38.3 ( $\text{CH}_2$ ), 38.4 (C), 43.9 (CH), 47.6 (C), 52.1 ( $\text{CH}_3$ ), 55.7 ( $\text{CH}_3$ ), 104.9 (C), 122.1 (C), 127.3 (C), 140.2 (C), 156.6 (C), 161.1 (C), 178.9 (C), 193.0 (CH).

**IR (film):** 2935, 1725, 1681, 1590, 1460, 1404, 1293, 1247, 1135, 1107, 1091, 1041  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 345.2066, found: 345.2057

2.10. Preparación del hidroxilaldehido **97**

Sobre una solución del compuesto **96** (1,20 g, 3,48 mmol) en diclorometano anhidro (40 ml) a 0°C y bajo atmósfera de argón, se añade lentamente AlBr<sub>3</sub> (2,79 g, 10,45 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 h. Después de ese tiempo, La CCF muestra la ausencia de del material de partida. Luego, la mezcla se vierte lentamente en hielo y se extrae con acetato de etilo (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua (3 x 20 ml) y salmuera (20 ml), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentran a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (5% de AcOEt / hexano) dando lugar al compuesto **97** (1,09 g, 95%) como un sólido blanco.

*(1R,4aS,10aR)-methyl 7-formyl-6-hydroxy-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (97).*

Pf 131–133 °C.

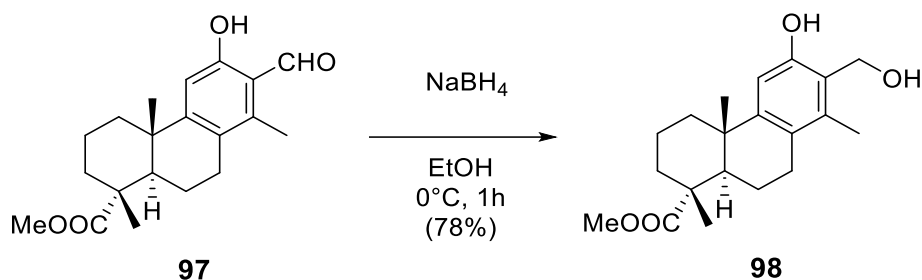
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 60.1 (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.21 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.42 – 1.56 (m, 2H), 1.63 – 1.86 (m, 5H), 2.14 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.58 – 2.78 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 6.77 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 11.82 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 13.5 (CH<sub>3</sub>), 16.7 (CH<sub>3</sub>), 18.6 (CH<sub>2</sub>), 21.6 (CH<sub>2</sub>), 24.6 (CH<sub>3</sub>), 27.3 (CH<sub>2</sub>), 36.6 (CH<sub>2</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (C), 43.6 (CH), 47.7 (C), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 111.3 (CH), 117.2 (C), 125.5 (C), 140.5 (C), 160.7 (C), 161.1 (C), 179.0 (C), 195.3 (CH).

IR (film): 2945, 1725, 1642, 1326, 1248, 1225, 1136, 766 cm<sup>-1</sup>.

HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 331.1909, found: 331.1906

2.11. Reducción del aldehído **97**

Se añade el borohidruro de sodio (187 mg, 4,95 mmol) a una solución agitada de **97** (1,09 g, 3,30 mmol) en etanol (15 ml), previamente enfriada a 0°C. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, la mezcla de reacción se enfria a 0°C y se detiene mediante una solución sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl (2 ml). El disolvente se elimina a vacío y el residuo obtenido se diluye con una mezcla de AcOEt: H<sub>2</sub>O (30:10 ml) y las fases se agitan y se separan. La fase acuosa se extrae nuevamente con AcOEt (2 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 20 ml), salmuera (20 ml), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtraron. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (30% de AcOEt / hexano) para producir el diol **98** como un sólido blanco (0,86 g, 78%).

*(1R,4aS,10aR)-methyl 6-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (98).*

Pf 98–101 °C.

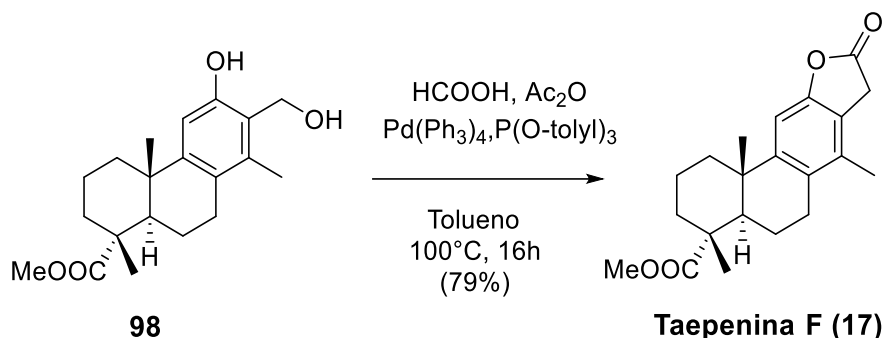
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 42.3 (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.20 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.32 – 1.53 (m, 2H), 1.62 – 1.80 (m, 5H), 2.06 (s, 3H), 2.09 – 2.26 (m, 2H), 2.53 – 2.71 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 4.92 (s, 2H), 6.70 (s, 1H), 7.56 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR ((CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 14.7 (CH<sub>3</sub>), 16.6 (CH<sub>3</sub>), 18.7 (CH<sub>2</sub>), 22.0 (CH<sub>2</sub>), 25.0 (CH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>), 37.4 (C), 38.4 (CH<sub>2</sub>), 44.3 (CH), 47.8 (C), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 110.1 (CH), 121.0 (C), 125.4 (C), 134.5 (C), 150.7 (C), 154.2 (C), 179.6 (C).

IR (film): 3368, 2931, 1725, 1704, 1604, 1421, 1247, 1135, 1035, 986, 770 cm<sup>-1</sup>.

## 2.12. Síntesis de taepenina F (17)



$\text{Pd(PPh}_3)_4$  (72 mg, 0.062 mmol),  $\text{P(o-tolyl)}_3$  (82 mg, 0.27 mmol) se introducen en un tubo y se hizo pasar un flujo de argón dentro del tubo durante 5 minutos. Luego, se agrega el tolueno (1 mL), acético anhidro (492 mg, 4.82 mmol), ácido fórmico (235 mg, 5.10 mmol) y, por último, una solución de **98** (450 mg, 1.35 mmol) en tolueno (3 mL). La mezcla resultante se sella y se agita a  $100^\circ\text{C}$  durante 16 h, momento en el que la CCF muestra la desaparición del compuesto **98**. El disolvente se evapora a vacío proporcionando un producto bruto que se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice (20% AcOEt / hexano) para dar la lactona **17** como un sólido blanco (366 mg, 79%).

**Taepenina F, (17)**

**P.f.** =  $193\text{--}195^\circ\text{C}$  (lit.  $194\text{--}195^\circ\text{C}$ )<sup>67</sup>.

**$[\alpha]_{\text{D}25}$**  =  $+25.0$  (c 0.6,  $\text{CHCl}_3$ ) (lit.  $67 +23.3$  (c 0.3,  $\text{CHCl}_3$ )).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.22 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.47 (m, 1H), 1.52 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.70 – 1.75 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.18 (dd,  $J = 12.7, 2.1$  Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.59 – 2.78 (m, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 6.91 (s, 1H).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ (ppm): 16.5 ( $\text{CH}_3$ ), 16.6 ( $\text{CH}_3$ ), 18.7 ( $\text{CH}_2$ ), 21.6 ( $\text{CH}_2$ ), 25.2 ( $\text{CH}_3$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 32.7 ( $\text{CH}_2$ ), 36.7 ( $\text{CH}_2$ ), 37.9 (C), 38.6 ( $\text{CH}_2$ ), 44.4 (CH), 47.7 (C), 52.1 ( $\text{CH}_3$ ), 104.2 (CH), 119.9 (C), 129.3 (C), 133.0 (C), 150.8 (C), 152.9 (C), 174.8 (C), 179.1 (C).

**IR (film)**: 2926, 2853, 1816, 1731, 1249, 1168, 1136,  $1012\text{ cm}^{-1}$ .

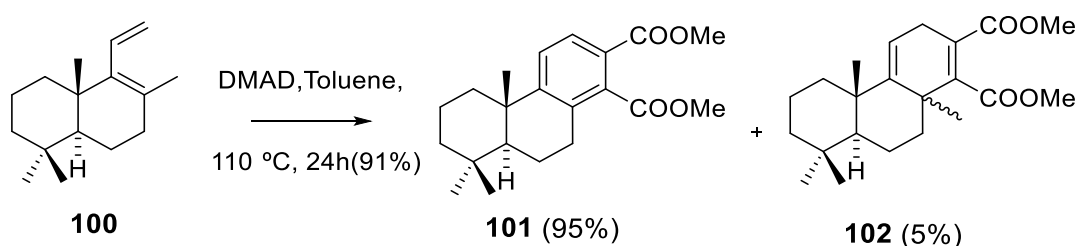
HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 343.1909, found: 343.1899

Los datos espectroscópicos del compuesto **17** coincidieron con los datos de la literatura.<sup>16a</sup>

### 3. Procedimientos experimentales hacia la síntesis del (5 $\alpha$ )-vouacapane-8(14),9(11)-diene (**5**).

#### 3.1. Reacción de cicloadición de Diels Alder sobre el dieno **100**

##### 3.1.1. Síntesis del derivado ftalato **101**



Se añade acetilendicarboxilato de dimetilo (1,9 g, 13,38 mmol) a una solución del dieno **100** (1 g, 4,58 mmol) en tolueno (8 ml), y la mezcla se calienta a reflujo durante 24 h. La reacción se controla mediante CCF (desde el principio se forma el compuesto **101** y, al mismo tiempo, el aducto **102**, que es un poco menos polar que el ftalato **101**). La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se evapora el disolvente a vacío para dar un producto bruto, que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando 5% de AcOEt / hexano para dar lugar a 1,43 g de **101** (91%) como un sirupo amarillo.

*(4bS,8aS)-4b,8,8-trimethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10- octahydrophenanthrene-1,2-dicarboxylate (101).*

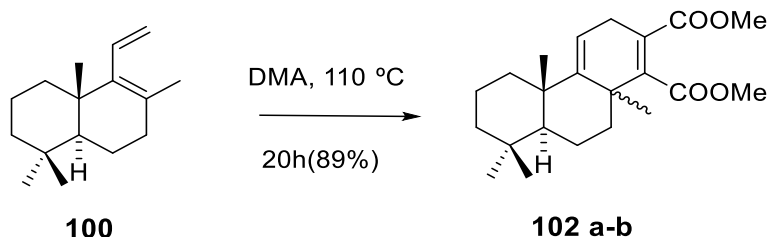
$[\alpha]_D^{25} = +14.7$  (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.91 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.17 (m, 1H), 1.28 (dd, J= 12.7, 2.2 Hz, 1H), 1.34 (ddd, J= 12.9, 12.9, 3.6 Hz, 1H), 1.47 (br d, J= 13.2 Hz, 1H), 1.55 – 1.80 (m, 3H), 1.88 (m, 1H), 2.27 (br d, J= 12.3 Hz, 1H), 2.79 (ddd, J = 17.5, 11.0, 7.6 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 17.5, 6.8 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 18.36 ( $\text{CH}_2$ ), 19.15 ( $\text{CH}_2$ ), 21.59 ( $\text{CH}_3$ ), 24.56 ( $\text{CH}_3$ ), 26.97 ( $\text{CH}_2$ ), 33.11 ( $\text{CH}_3$ ), 33.42 (C), 38.52 (C), 38.78 ( $\text{CH}_2$ ), 41.34 ( $\text{CH}_2$ ), 49.25 (CH), 52.25 ( $\text{CH}_3$ ), 52.39 ( $\text{CH}_3$ ), 124.18 (C), 125.48 (CH), 127.31 (CH), 132.56 (C), 135.74 (C), 155.87 (C), 166.13 (C), 170.28 (C).

HRMS (ESI)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) 367.1885, found: 367.1879.

### 3.1.2. Síntesis del cicloadducto 102



Se añade DMAD (1,1 g, 7,74 mmol) al dieno **100** (0,8 g, 3,66 mmol) y la mezcla se sella en un tubo bajo atmósfera de argón y se calienta a 110°C durante 20 h. En este momento, la CCF no muestra material de partida restante. La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando AcOEt al 5% / hexano para dar 1,17 g de **102 a** y su 8-epímero **102 b** (relación 9: 1) (89%) se obtiene como un mezcla sólida blanca (9: 1).

*(4bS,8aS,10aS)-4b,8,8,10a-tetramethyl-3,4b,5,6,7,8,8a,9,10,10a*  
*decahydrophenanthrene-1,2-dicarboxylate (102)*

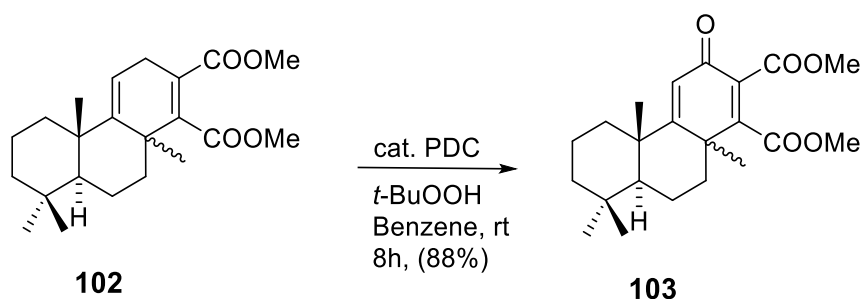
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.85 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 0.84 – 2.06 (m, 11H), 2.78 (dd,  $J = 21.8, 1.9$  Hz, 1H), 3.15 (dd,  $J = 21.8, 6.4$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.65 (dd,  $J = 6.5, 1.8$ , 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz)  $\delta$  (ppm): 17.47 ( $\text{CH}_2$ ), 19.36 ( $\text{CH}_2$ ), 21.36 ( $\text{CH}_3$ ), 25.62 ( $\text{CH}_3$ ), 26.17 ( $\text{CH}_3$ ), 26.88 ( $\text{CH}_2$ ), 27.67 ( $\text{CH}_2$ ), 32.91 ( $\text{CH}_3$ ), 34.00 (C), 39.13 (C), 39.48 (C), 40.41 ( $\text{CH}_2$ ), 42.25 ( $\text{CH}_2$ ), 44.14 (CH), 52.01 ( $\text{CH}_3$ ), 52.23 ( $\text{CH}_3$ ), 115.65 (CH), 126.82 (C), 152.62 (C), 155.49 (C), 166.38 (C), 169.81 (C).

IR (film): 1027, 1169, 1196, 1374, 1433, 1723, 2868, 2947  $\text{cm}^{-1}$ .

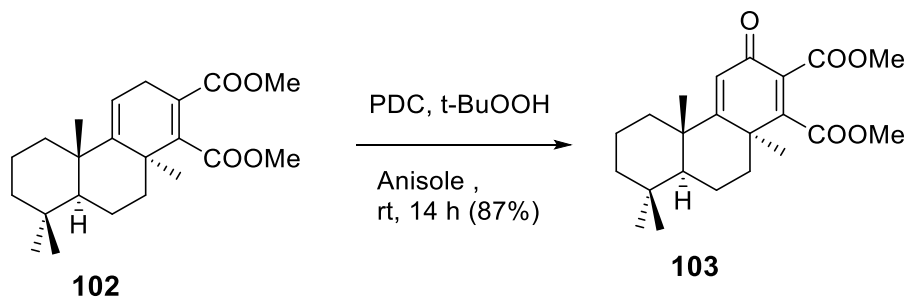
### 3.2. Síntesis de la dienona 103

#### 3.2.1. Tratamiento del cicloadducto 102 con PDC y hidroperóxido de *terc*-butílico en benzeno



A una solución del compuesto **102** (300 mg, 0.833 mmol) en benceno (1 ml), se añaden a 0 °C dicromato de piridinio (PDC) (30 mg, 0.079 mmol) y el hidroperóxido *terc*butílico 5M (0.4 mL, 2 mmol). La mezcla se sigue agitando a temperatura ambiente durante 8 h. En este momento, la CCF no muestra material de partida restante. Luego, la mezcla de reacción se inactiva con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sat. acuoso (0,3 ml) y se diluye con AcOEt - H<sub>2</sub>O (15: 5 ml). Las fases se agitan y se separan, y la fase orgánica se lava nuevamente con agua (5 ml) y salmuera (5 ml). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh y se concentra para dar un producto bruto que se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, usando AcOEt / hexano al 20% para dar la dienona **103** (274 mg, 88%) como un sólido blanco.

#### 3.2.2. Tratamiento del cicloadducto 102 con el sistema PDC/hidroperóxido de *terc*-butílico



A una solución del compuesto **102** (150 mg, 0.41 mmol) en anisole (2 ml), se le añade sucesivamente a 0°C, dicromato de piridinio (PDC) (31 mg, 0.083 mmol) y hidroperóxido de *terc*-butílico 5 M (0.25 mL, 1.23 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura



ambiente durante 14 h, momento en el cual se comprueba mediante CCF el total consumo del material de partida. Luego, la mezcla de reacción se detiene con una solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  sat. (0,3 ml) y se diluye con AcOEt -  $\text{H}_2\text{O}$  (15: 5 ml). Las fases se agitan y se separan y la fase orgánica se lava nuevamente con agua (5 ml) y salmuera (5 ml). Tras secar sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh., se concentra para dar un producto bruto que se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice, usando AcOEt / hexano al 5% para recuperar el anisol, y usando AcOEt / hexano al 20% para aislar el compuesto **103** (133 mg, 87%) como un sólido blanco.

***Dimethyl (4bS,8aS,10aS)-4b,8,8,10a-tetramethyl-3-oxo- 3,4b,5,6,7,8,8a,9,10,10a-decahydrophenanthrene-1,2-dicarboxylate (103).***

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.90 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.18 (ddd,  $J= 12.9, 12.9, 3.6$  Hz, 1H), 1.37 (ddd,  $J= 13.4, 13.4, 4.0$  Hz, 1H), 1.48 (br d,  $J= 13.2$  Hz, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.53 – 1.78 (m, 4H), 1.83 (m, 1H), 1.91 – 2.01 (m, 2H), 2.06 (br d,  $J = 14.0$  Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.27 (m, 1H)

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 16.58 ( $\text{CH}_2$ ), 19.02 ( $\text{CH}_2$ ), 21.28 ( $\text{CH}_3$ ), 24.68 ( $\text{CH}_2$ ), 25.35 ( $\text{CH}_3$ ), 29.90 ( $\text{CH}_3$ ), 32.96 ( $\text{CH}_3$ ), 33.90 (C), 39.07 ( $\text{CH}_2$ ), 41.49 (C), 41.64 ( $\text{CH}_2$ ), 41.88 (C), 42.65 (CH), 52.64 ( $\text{CH}_3$ ), 52.67 (C), 122.46 (CH), 132.01 (C), 157.20 (C), 165.38 (C), 166.45 (C), 180.17 (C), 183.10.

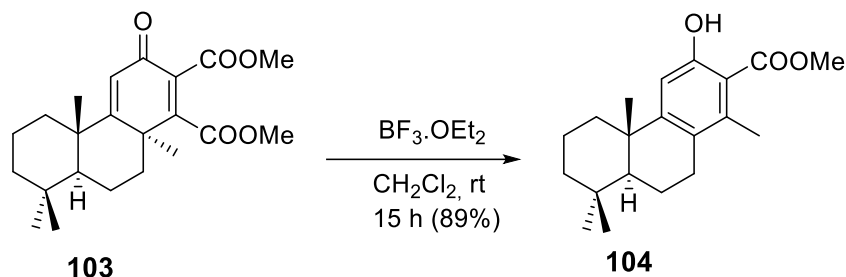
**IR (film):** 772, 1027, 1096, 1207, 1261, 1435, 1659, 1735, 2927, 2949  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_5$  (M+H<sup>+</sup>) 375.2171, found: 375.2158.

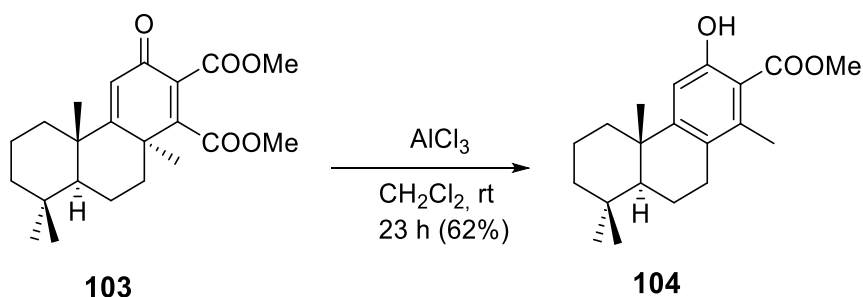
### 3.3. Estudio del reordenamiento dienona-Fenol

El reordenamiento de dienona-fenol se investigó ensayando el tratamiento de dienona (**103**) bajo diferentes condiciones ácidas.

## 3.3.1. Síntesis del hydroxymonoéster 104

3.3.1.1. Tratamiento de la dienona 103 con  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 

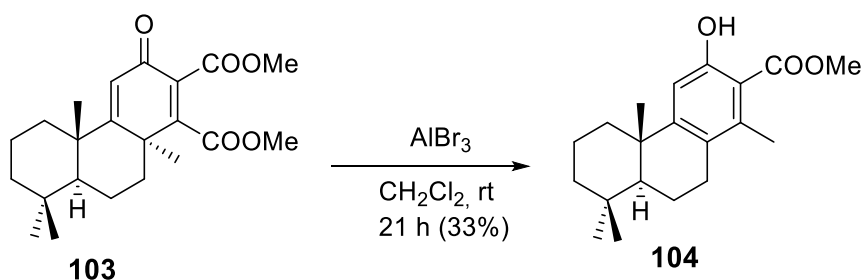
A una solución agitada del producto **103** (467 mg, 1,24 mmol) en diclorometano seco (5 ml) se le añade gota a gota  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (2 ml, 16,19 mmol) a  $0^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se agita durante 15 h a temperatura ambiente, momento en el que se comprueba mediante CCF el total consumo del material de partida. Luego, la reacción se detiene con agua (5 ml) y la mezcla se agita durante 5 minutos adicionales. El disolvente se evapora a vacío y se añade  $\text{AcOEt} - \text{H}_2\text{O}$  (30: 10 ml). Las fases se agitan y se separan y la capa orgánica se lava con agua (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh. y se filtra. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, usando 5% de  $\text{AcOEt} / \text{Hexano}$ , para dar lugar al fenol **104** (349 mg, 89%), como sirupo incoloro.

3.3.1.2. Tratamiento de la dienona 103 con  $\text{AlCl}_3$ 

A una solución del producto **103** (123 mg, 0,329 mmol) en diclorometano seco (5 mL) previamente enfriada a  $0^\circ\text{C}$ , y bajo atmósfera de argón, se le agrega cloruro de aluminio (131 mg, 0,985 mmol) y la mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 23 h. Luego, la mezcla de reacción se enfría a  $0^\circ\text{C}$  y se añade agua (1 ml) para

detener la reacción. El disolvente se evapora a vacío, y se añade AcOEt - H<sub>2</sub>O (20: 5 ml), y las fases se agitan y se separan. La capa orgánica se lava con agua (2 x 5 ml), salmuera (10 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh y se filtra. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que después de la cromatografía flash en gel de sílice, usando 5% de AcOEt / hexano, proporciona el fenol **104** (64 mg ,62%).

### 3.3.1.3. Tratamiento de la dienona **103** con AlBr<sub>3</sub>



Se añade el bromuro de aluminio (315 mg, 1,18 mmol) a una solución de **103** (147 mg, 0,39 mmol) en diclorometano seco (2 ml), previamente enfriado a 0 ° C, y la mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 21 h. Luego, la mezcla de reacción se enfría a 0°C y se añade agua (1 ml) para detener la reacción. El disolvente se evapora a vacío y se añade AcOEt - H<sub>2</sub>O (25: 10 ml) y las fases se agitan y se separan. La capa orgánica se lava con agua (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y se filtra. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que después de la cromatografía flash en gel de sílice sobre gel de sílice (5% AcOEt / hexano) prinde 41 mg (33%) del fenol **104**.

*(4bS,8aS)-methyl 3-hydroxy-1,4b,8,8-tetramethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydrophenanthrene-2-carboxylate (104).*

$[\alpha]_{\text{D}25} = +2.7$  (c 0.4, CHCl<sub>3</sub>).

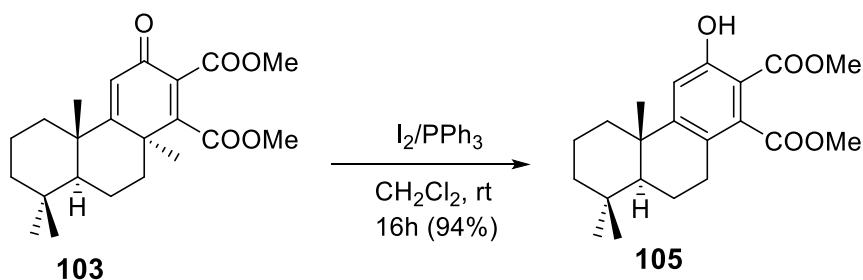
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.92 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.19 (ddd, J 13.4, 13.4, 4.1 Hz, 1H), 1.26 (dd, J = 12.7, 2.2 Hz, 1H), 1.36 (ddd, J= 12.9, 12.9, 3.7 Hz, 1H), 1.47 (br d, J= 13.2 Hz, 1H) 1.56 – 1.80 (m, 4H), 1.95 (m, 1H), 2.24 (br d, J = 12.5 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.58 (ddd, J = 16.8, 11.6, 7.9 Hz, 1H), 2.78 (ddd, J = 16.8, 6.7, 1.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 6.82 (s, 1H), 10.29 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 18.22 ( $\text{CH}_3$ ), 19.34 ( $\text{CH}_2$ ), 19.45 ( $\text{CH}_2$ ), 21.82 ( $\text{CH}_3$ ), 24.59 ( $\text{CH}_3$ ), 28.65 ( $\text{CH}_2$ ), 33.30 ( $\text{CH}_3$ ), 33.58 (C), 38.61 (C), 39.12 ( $\text{CH}_2$ ), 41.56 ( $\text{CH}_2$ ), 49.27 (CH), 52.14 ( $\text{CH}_3$ ), 111.09 (CH), 111.67 (C), 126.34 (C), 138.74 (C), 157.55 (C), 159.07 (C), 172.00 (C).

IR (film): 802, 1113, 1138, 1198, 1212, 1245, 1276, 1295, 1330, 1345, 1437, 1459, 1566, 1599, 1663, 1732, 2852, 2924  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS (ESI)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_3$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 317.2117, found: 317.2103.

### 3.3.2. Síntesis del hydroxydi-éster 105



A una solución de  $\text{PPh}_3$  (45 mg, 0,17 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añade  $\text{I}_2$  (43 mg, 0,17 mmol), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de ese tiempo, la mezcla se agrega a una solución del producto **103** (57 mg, 0.15 mmol) en diclorometano (3 ml). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 h, momento en el que se comprueba mediante CCF el total consumo del material de partida. La reacción se detiene con  $\text{NaHSO}_3$  acuoso al 10% (1 ml) y el disolvente se elimina a vacío. Luego, se añade  $\text{AcOEt}$  - agua (20: 5 ml) y las fases se agitan y se separan, la fase orgánica se lava con agua (5 ml), salmuera (5 ml), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh, se filtra y se concentra para dar un producto bruto. Purificación por cromatografía sobre gel de sílice, usando 5% de  $\text{AcOEt}$  / hexano, proporciona el fenol **105** (51 mg, 94%), como un sirupo incoloro.

*(4bS,8aS)-dimethyl 3- hydroxy-4b,8,8-trimethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydrophenanthrene-1,2- dicarboxylate (105).*

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +42$  (c 1.5,  $\text{CHCl}_3$ ).

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.91 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.18 (ddd, J= 13.5, 13.5, 4.1 Hz, 1H), 1.27 (dd, J = 12.6, 2.3 Hz, 1H), 1.36 (ddd, J= 12.9, 12.9, 3.7 Hz, 1H), 1.47 (br d, J= 13.3 Hz, 1H), 1.56 – 1.80 (m, 4H), 1.86 (m, 1H), 2.21 (br d, J = 12.2 Hz, 1H), 2.66 (ddd, J = 17.0, 11.0, 7.6 Hz, 1H), 2.89 (ddd, J = 17.0, 7.0, 1.8 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 6.97 (s, 1H), 10.63 (s, 1H).

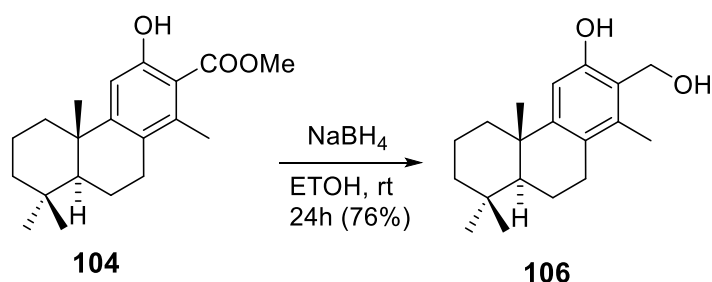
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 18.62 (CH<sub>2</sub>), 19.27 (CH<sub>2</sub>), 21.78 (CH<sub>3</sub>), 24.48 (CH<sub>3</sub>), 26.43 (CH<sub>2</sub>), 33.22 (CH<sub>3</sub>), 33.62 (C), 38.86 (C), 38.88 (CH<sub>2</sub>), 41.47 (CH<sub>2</sub>), 49.13 (CH), 52.37 (CH<sub>3</sub>), 52.86 (CH<sub>3</sub>), 106.94 (C), 114.84 (CH), 123.90 (C), 134.99 (C), 159.54 (C), 159.66 (C), 169.33 (C), 169.96 (C).

**IR (film):** 748, 804, 954, 1114, 1129, 1174, 1200, 1214, 1246, 1326, 1439, 1673, 1736, 2849, 2925 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub> (M+H<sup>+</sup>) 361.2015, found: 361.2002.

### 3.4. Síntesis del diol **106**

#### 3.4.1. Tratamiento del fenol **104** con NaBH<sub>4</sub>



A una solución agitada de **104**, (231 mg, 0,73 mmol) en etanol (5 ml), previamente enfriada a 0 °C, se le añade borohidruro de sodio (250 mg, 6.61 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Luego, la mezcla de reacción se enfría a 0°C y se añade con sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl (2 ml). El disolvente se elimina a vacío y se añaden AcOEt – H<sub>2</sub>O (30: 10 ml) y HCl 2 N (3 ml). A continuación, las fases se agitan y se separan y la fase acuosa se extrae nuevamente con AcOEt (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

anh. y se filtra. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, usando AcOEt / hexano al 30%, para dar el diol **106** como sirupo incoloro (160 mg, 76%).

**(4*bS*,8*aS*)-2-(Hydroxymethyl)-1,4*b*,8,8-tetramethyl-4*b*,5,6,7,8,8*a*,9,10-octahydrophenanthren-3-ol (106).**

$[\alpha]_D^{25} = +53.5$  (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>).

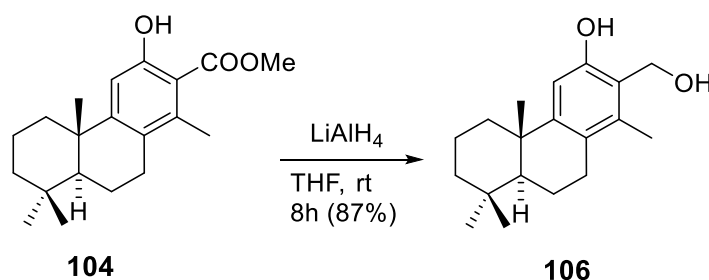
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.99 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.20 (ddd, J= 13.5, 13.5, 4.1 Hz, 1H), 1.27 (dd, J = 12.6, 2.3 Hz, 1H), 1.34 (ddd, J= 13.0, 13.0, 3.8 Hz, 1H), 1.47 (br d, J= 13.4 Hz, 1H), 1.56 – 1.80 (m, 4H), 1.94 (m, 1H), 2.21 (br d, J = 12.2 Hz, 1H), 2.57 (ddd, J = 17.0, 11.0, 7.6 Hz, 1H), 2.75 (dd, J = 17.0, 6.7 Hz, 1H), 4.93 (d, J= 13.4 Hz, 1H), 4.95 (d, J= 13.4 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H) 7.22 (br s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.67 (CH<sub>3</sub>), 19.23 (CH<sub>2</sub>), 19.39 (CH<sub>2</sub>), 21.61 (CH<sub>3</sub>), 24.74 (CH<sub>3</sub>), 28.47 (CH<sub>2</sub>), 33.23 (CH<sub>3</sub>), 33.38 (C), 37.93 (C), 39.20 (CH<sub>2</sub>), 41.56 (CH<sub>2</sub>), 49.66 (CH), 60.65 (CH<sub>2</sub>), 110.19 (CH), 120.58 (C), 125.69 (C), 134.22 (C), 151.49 (C), 153.94 (C).

**IR (film):** 756, 1003, 1041, 1198, 1216, 1292, 1374, 1419, 1439, 1470, 1575, 1604, 2864, 2922 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O (M+H+-H<sub>2</sub>O) 271.2062, found: 271.2052.

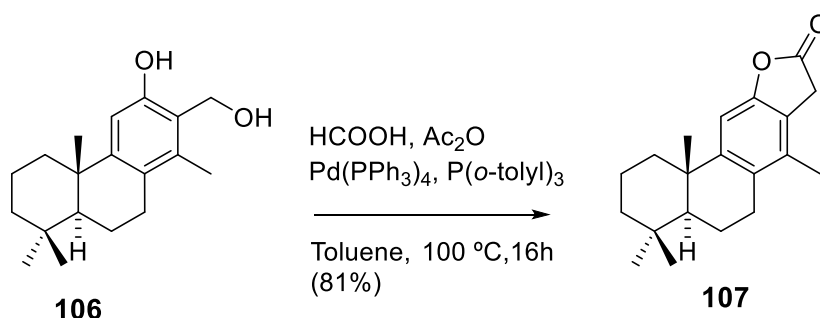
### 3.4.2. Tratamiento del fenol **104** con LiAlH<sub>4</sub>



A una solución agitada de **104** (529 mg, 1,67 mmol) en THF (10 ml), previamente enfriada a 0°C, se le añade cuidadosamente el hidruro de litio y aluminio (130 mg, 3,42 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 8 h. . Luego, la mezcla de reacción se enfría a 0°C y se agrega una solución sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl (5 ml). El

disolvente se elimina a vacío y se añade AcOEt - H<sub>2</sub>O (40: 10 ml) y HCl 2N (5 ml). A continuación, las fases se agitan y se separan y la fase acuosa se extrae nuevamente con AcOEt (20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y se filtra. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, usando 30% de AcOEt / hexano, para dar el diol **106** (418 mg, 87%).

### 3.5. Síntesis de la lactona **107**



El Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (65 mg, 0.056 mmol), P (o-tolyl)<sub>3</sub> (85 mg, 0.24 mmol) , se introducen en un tubo y se hace pasar un flujo de argón dentro del tubo durante 3 minutos. Luego se agrega tolueno (1 ml), una solución de **106** (350 mg, 1.21 mmol) en tolueno (2 ml), acético anhidro (440 mg, 4.31 mmol) y ácido fórmico (210 mg, 4.56 mmol). La mezcla resultante se sella y se agita a 100°C durante 16 h, momento en el que la CCF muestra la desaparición del diol **106**. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto crudo gris que se purifica por cromatografía en gel de sílice, usando AcOEt al 15% / hexano, para dar lugar al compuesto **107** como un sólido blanco (292 mg, 81%).

*(4aS,11bS)-4,4,7,11b-Tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,11b-octahydrophenanthro[3,2-b]furan-9(8H)-one (107).*

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +83.3$  (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 0.93 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.20 (ddd, J = 13.6, 13.6, 4.0 Hz, 1H), 1.27 (dd, J = 12.7, 1.9 Hz, 1H), 1.35 (ddd, J = 13.1, 13.1, 3.9 Hz, 1H), 1.49 (br d, J = 13.3 Hz, 1H), 1.52 – 1.82 (m, 4H), 1.96 (m, 1H),

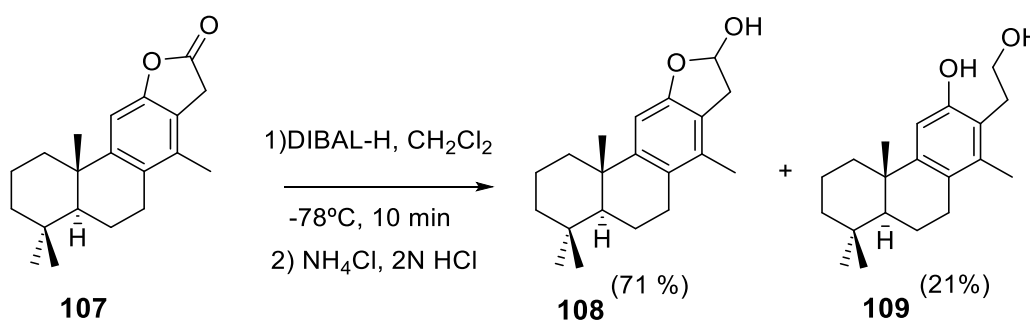
2.11 (s, 3H), 2.22 (br d, J = 12.3 Hz, 1H), 2.60 (ddd, J = 17.4, 11.2, 7.6 Hz, 1H), 2.78 (dd, J = 17.4, 6.7 Hz, 1H), 3.60 (s, 2H), 6.92 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 16.36 (CH), 18.87 (CH<sub>2</sub>), 19.3 (CH<sub>2</sub>), 21.61 (CH<sub>3</sub>), 24.91 (CH<sub>3</sub>), 27.89 (CH<sub>2</sub>), 32.53 (CH<sub>2</sub>), 33.23 (CH<sub>3</sub>), 33.44 (C), 38.41 (C), 39.36 (CH<sub>2</sub>), 41.50 (CH<sub>2</sub>), 49.76 (CH), 104.23 (CH), 119.51 (C), 129.36 (C), 132.73 (C), 151.43 (C), 152.69 (C), 174.77 (C).

IR (film): 772, 872, 1010, 1133, 1219, 1374, 1416, 1469, 1731, 1813, 2850, 2922  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS (ESI) m/z: calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_2$  (M+H<sup>+</sup>) 299.2011, found: 299.2000.

### 3.6. Reducción de la lactona: Síntesis del lactol **108**



Se añade el DIBAL-H (0,4 ml, 1 M en tolueno, 0,4 mmol) a una solución agitada de lactona **107** (113 mg, 0,379 mmol) en diclorometano seco (5 ml), previamente enfriado a  $-78^\circ\text{C}$ , y la mezcla se agita durante 10 min. Luego, la mezcla de reacción se enfría y se añade  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 ml) a  $-78^\circ\text{C}$ , después HCl 2 N (1 ml) y por último y AcOEt - agua (20: 5 ml). Las fases se agitan y se separan, y la fase acuosa se extrae nuevamente con AcOEt (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh y se filtran. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, usando 20% de AcOEt / hexano, proporcionando el lactol **108** (81 mg, 71%) y el diol **109** (25 mg, 21%).

**(4a*S*,11b*S*)-4,4,7,11b-tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8,9,11b-decahydrophenanthro[3,2-*b*]furan-9-ol (108) :**



**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.92 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.20 (ddd, J= 13.4, 13.4, 4.0 Hz, 1H), 1.27 (dd, J = 12.7, 1.9 Hz, 1H), 1.34 (m, 1H), 1.46 (br d, J= 13.5 Hz, 1H), 1.55 – 1.80 (m, 4H), 1.93 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.21 (br d, J = 12.2 Hz, 1H), 2.58 (ddd, J = 17.0, 11.0, 7.6 Hz, 1H), 2.75 (dd, J = 17.0, 6.7 Hz, 1H), 2.95 (ddd, J = 16.4, 5.0, 1.5 Hz, 1H), 3.29 (ddd, J = 16.4, 9.0, 6.6 Hz, 1H), 6.03 (dd, J = 6.5, 2.2 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 16.30 (2CH<sub>3</sub>), 19.09 (2CH<sub>2</sub>), 19.44 (2CH<sub>2</sub>), 21.63 (2CH<sub>3</sub>), 24.84 (CH), 24.94 (CH), 27.89 (CH<sub>2</sub>), 27.92 (CH<sub>2</sub>), 33.30 (2CH<sub>3</sub>), 33.42 (2C), 37.47 (CH<sub>2</sub>), 37.50 (CH<sub>2</sub>), 38.27 (2C), 39.36 (CH<sub>2</sub>), 39.43 (CH<sub>2</sub>), 41.61 (2CH<sub>2</sub>), 49.95 (CH), 50.00 (CH), 100.56 (CH), 100.64 (C), 103.16 (C), 103.19 (CH), 121.18 (2C), 126.31 (2C), 132.79 (2C), 150.76 (2C), 155.49, 155.49 (C).

**IR (film):** 772, 941, 1022, 1081, 1244, 1600, 1618, 1471, 2852, 2923, 3423.

**HRMS** (ESI) m/z: calcd for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 301.2168, found: 301.2161.

*(4bS,8aS)-2-(2-hydroxyethyl)-1,4b,8,8-tetramethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydrophenanthren-3-ol (109) :*

**[α]<sub>D</sub>25=** +41.4 (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

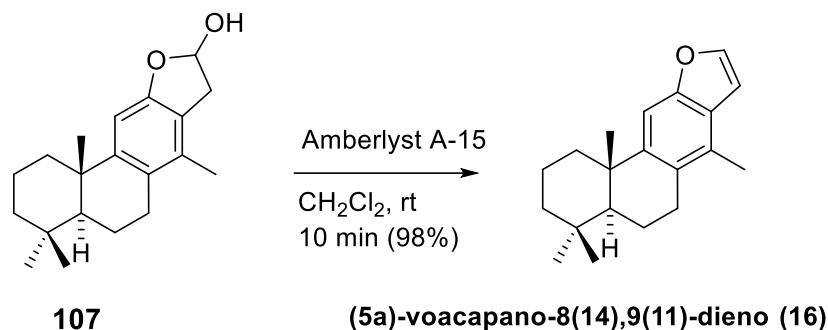
**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.92 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.19 – 1.41 (m, 3H), 1.46 (br d, J= 13.5 Hz, 1H), 1.55 – 1.79 (m, 4H), 1.93 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.22 (m, 1H), 2.59 (ddd, J = 17.0, 11.0, 7.6 Hz, 1H), 2.76 (dd, J = 17.0, 6.7 Hz, 1H), 2.87 – 3.03 (m, 2H), 3.85 – 3.95 (m, 2H), 6.77 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 15.32 (CH), 19.35 (CH<sub>2</sub>), 19.44 (CH<sub>2</sub>), 21.63 (CH<sub>3</sub>), 24.84 (CH<sub>3</sub>), 28.85 (CH<sub>2</sub>), 29.47 (CH<sub>2</sub>), 33.27 (CH<sub>2</sub>), 33.39 (C), 37.88 (C), 39.24 (CH<sub>3</sub>), 41.63 (CH<sub>2</sub>), 49.77 (CH<sub>3</sub>), 63.89 (CH<sub>2</sub>), 110.44 (CH), 122.28 (C), 126. (C), 135.25 (C), 150.07 (C), 153.13 (C).

**IR (film):** 772, 1040, 1219, 1418, 1465, 1599, 2852, 2923, 3346 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS** (ESI) m/z: calcd for C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 303.2324, found: 303.2315.

### 3.7. Deshidratación del lactol **81**: Síntesis del (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**)



A una solución de lactol **107** (50 mg, 0,166 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) se le añade Amberlist A-15 (85 mg). La mezcla de reacción se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente y se filtra. La eliminación del disolvente a vacío dio lugar a 46 mg del furano **16** (98%) como un sólido blanco. Pf 50-51 ° C.

#### (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno: (**16**)

Pf 50-51 ° C.

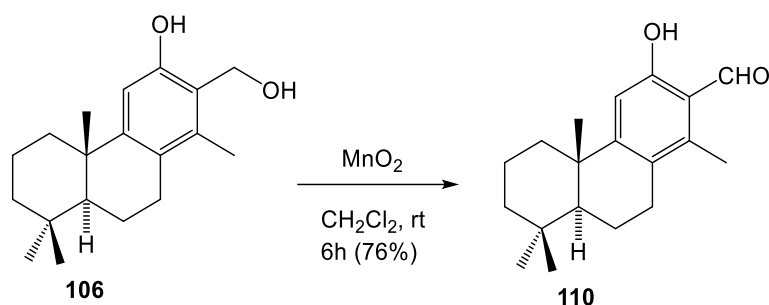
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +48.2$  (c 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.52 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.74 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 2.93 (dd,  $J = 17.0, 6.7$  Hz, 1H), 2.75 (ddd,  $J = 17.0, 11.1, 8.2$  Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.34 (br d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 1.99 (m, 1H), 2.84 – 2.70 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.57 – 1.41 (m, 2H), 1.37 (dd,  $J = 12.6, 2.0$  Hz, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.24 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (s, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 15.90 ( $\text{CH}_3$ ), 19.21 ( $\text{CH}_2$ ), 19.51 ( $\text{CH}_2$ ), 21.70 ( $\text{CH}_3$ ), 25.39 ( $\text{CH}_3$ ), 28.00 ( $\text{CH}_2$ ), 33.32 ( $\text{CH}_3$ ), 33.50 (C), 38.44 (C), 39.80 ( $\text{CH}_2$ ), 41.66 ( $\text{CH}_2$ ), 49.88 (CH), 104.40 (CH), 104.93 (CH), 125.16 (C), 127.73 (C), 128.07 (C), 144.07 (CH), 147.96 (C), 153.53 (C).

**IR (film)**: 772, 1014, 1140, 1219, 1465, 1462, 2852, 2924  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS** (ESI)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 283.2062, found: 283.2050.

3.8. Síntesis del hidroxialdehido **110**

Sobre una solución del alcohol **106** (1.28 g, 3.57 mmol) en diclorometano (30 mL), se añade  $\text{MnO}_2$  (6.2 g, 71.5 mmol) y se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 6 h. Tras ese tiempo, la mezcla se filtra directamente por cromatografía en columna de gel de sílice (30% AcOEt/hexano) para dar el hidroxialdehido **110** (0.97 g, 76%) como un sólido blanco.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +48.2$  (c 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ).

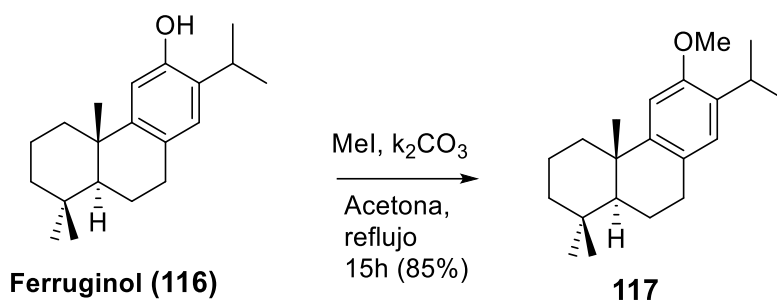
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 11.84 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 2.82 (ddd,  $J = 16.9, 6.9, 1.5$  Hz, 1H), 2.62 (ddd,  $J = 16.9, 11.5, 7.9$  Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.26 (dd,  $J = 12.7, 1.6$  Hz, 1H), 2.00 (ddt,  $J = 13.6, 8.0, 2.0$  Hz, 1H), 1.79 (t,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 1.77 – 1.69 (m, 1H), 1.69 – 1.62 (m, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.51 (dtd,  $J = 13.3, 3.3, 1.5$  Hz, 1H), 1.44 – 1.33 (m, 1H), 1.33 – 1.24 (m, 1H), 1.22 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.96 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 195.14 (CHO), 161.52 (C), 160.98 (C), 140.19 (C), 125.66 (C), 116.94 (C), 111.27 (CH), 48.96 (CH), 41.37 ( $\text{CH}_2$ ), 38.97 (C), 38.88 ( $\text{CH}_2$ ), 33.52 (C), 33.17 ( $\text{CH}_3$ ), 27.67 ( $\text{CH}_2$ ), 24.30 ( $\text{CH}_3$ ), 21.71 ( $\text{CH}_3$ ), 19.25 ( $\text{CH}_2$ ), 18.95 ( $\text{CH}_2$ ), 13.35 ( $\text{CH}_3$ ).

**IR (film):** 772, 1014, 1140, 1219, 1465, 1462, 2852, 2924  $\text{cm}^{-1}$ .

**4. Procedimientos experimentales hacia la síntesis del análogo 14-desmetil (5 $\alpha$ )-vouacapane-8(14),9(11)-diene (16) a partir del ácido deshidroabiético (51)**

**4.1. Protección del ferruginol (116).**



Sobre una solución del compuesto **116** (67 mg, 0.234 mmoles) en acetona (3 mL) se añade  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (41 mg, 0.3 mmol) y MeI (43 mg, 0.3 mmol) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 15 h. Tras ese tiempo, el disolvente se elimina a vacío y el residuo obtenido se diluye con éter - $\text{H}_2\text{O}$  (15 : 5 mL) y las fases se agitan y se separan. La fase orgánica se lava con salmuera (5 mL) y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Tras filtrar y evaporar el disolvente a vacío, se obtiene un crude el cual se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (5% AcOEt/hexano) para dar lugar al compuesto **117** (57 mg, 85%) como un sirupo incoloro.

**(+)-(4a*S*,10a*S*)-7-Isopropyl-6-methoxy-1,1,4a-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene (117)**

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +61.9$  (c 0.8,  $\text{CHCl}_3$ ).

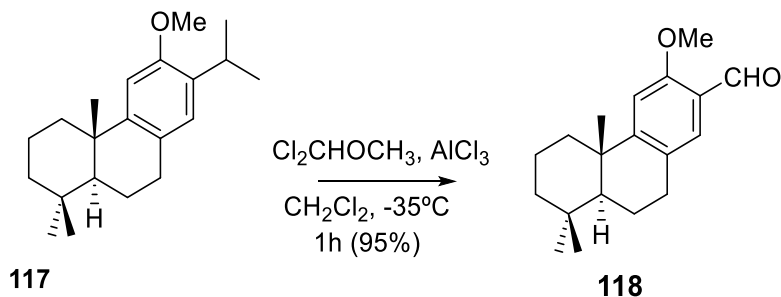
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.95(3H, s), 0.97 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.23 (6H, d,  $J = 6.6$  Hz), 1.20–1.92(8H, m), 2.28 (1H, m), 2.75–2.91 (2H, m), 3.25 (1H, sep,  $J = 6.6\text{Hz}$ ), 3.82, (3H, s), 6.75 (1H, s), 6.87 (1H, s).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 19.4 ( $\text{CH}_2$ ), 19.6 ( $\text{CH}_2$ ), 21.8 ( $\text{CH}_3$ ), 22.9 ( $\text{CH}_3$ ), 23.1 ( $\text{CH}_3$ ), 25.0 ( $\text{CH}_3$ ), 26.6 (CH), 30.0 ( $\text{CH}_2$ ), 33.6 ( $\text{CH}_3$ ), 33.7 ( $\text{CH}_3$ ), 38.1 (C), 39.1 ( $\text{CH}_2$ ), 41.9 (C), 50.7 (C), 55.8, 106.7 (CH), 126.6 (CH), 127.1 (C), 134.3 (C), 148.3 (C), 155.2 (C), .

**IR** (film): 1613, 1573, 1499, 1463, 1404, 1374, 1323, 1249, 1207, 1165, 1104, 969, 909, 892, 735  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI)** (m/z): calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NaO}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  323.2345, found 323.2326.

#### 4.2. Tratamiento del 12-metoxiderivado **117** con diclorometilmetil éter y $\text{AlCl}_3$ .



Sobre una disolución del éter aromático **117** (9.9 g, 28.8 mmoles) en diclorometano anhidro (80 mL) enfriada a  $-35^\circ\text{C}$  y bajo atmósfera de argón, se añade diclorometilmetil éter (7.7 ml, 86.3 mmoles). A esta mezcla, se le añade lentamente, bajo agitación vigorosa, tricloruro de aluminio (11.5 g, 86.6 mmoles) en pequeñas porciones durante un periodo de tiempo de 15 min. A continuación, la mezcla se deja reaccionar a  $-35^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Tras comprobar mediante CCF la conversión completa del compuesto **117**, se vierte lentamente sobre una mezcla de hielo-agua y se extrae la mezcla con acetato de etilo (2 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (3 x 30 mL) y salmuera (30 mL). Se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna con gel de sílice (5% AcOEt/hexano), obteniendo el aldehído **118** (9.4 g, 95%) como un sirupo incoloro.

**(4b*S*,8a*S*)-3-metoxy-4b,8,8-trimethyl-4b,5,6,7,8,8<sup>a</sup>,9,10-octahidrophenantrene-2-carbaldehyde (118):**

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +11.73 \quad (c = 1.2, \text{CHCl}_3)$$

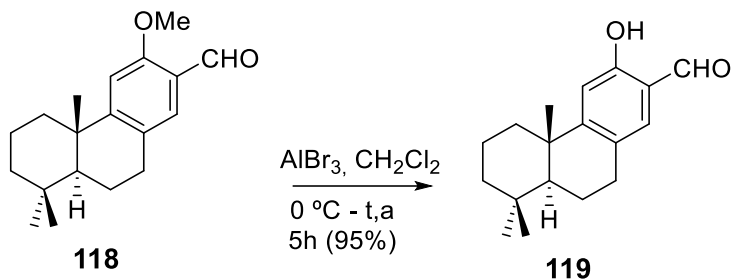
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.94 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.30 (dd,  $J = 11.8, 9.4$  Hz, 2H). 1.53 – 1.46 (m, 2H), 1.73 – 1.63 (m, 2H), 1.94 – 1.81 (m, 2H), 2.33 – 2.24 (m, 1H), 2.97 – 2.75 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 6.87 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 10.39 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$  (ppm): 18.89. ( $\text{CH}_2$ ), 19.20, ( $\text{CH}_2$ ), 21.70, ( $\text{CH}_3$ ), 24.47 ( $\text{CH}_3$ ), 29.21, ( $\text{CH}_2$ ), 33.25 (CH), 33.59 (C), 38.75( $\text{CH}_2$ ), 38.88 (C), 41.48 ( $\text{CH}_2$ ), 49.83 (CH), 55.57 (CH), 107.39 (CH), 122.57 (C), 127.87 (C), 129.01 (CH), 159.03 (C), 160.00 (C), 189.66 (CHO).

**IR (film):** 772, 1038, 1204, 1218, 1263, 1411, 1462, 1608, 1682, 1728, 2867, 2932  $\text{cm}^{-1}$

**HRMS (ESI)** (m/z): calcd for C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>) 287.2011, found 287.2014.

### 4.3. Síntesis del 14-desmetil hidroxifenol 119.



Sobre una disolución de **118** (330 mg, 1.15 mmoles) en diclorometano anhidro (10 mL) enfriada a 0°C y bajo atmósfera de argón, se añade AlBr<sub>3</sub> (0.799 g, 3.03 mmoles) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 5h. Tras comprobar mediante CCF la conversión completa del compuesto **118**, se vierte lentamente la mezcla de reacción sobre una mezcla de hielo (5g) y se espera hasta que se derrita el hielo. A continuación, se extrae la mezcla con acetato de etilo (2 x 20 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (3 x 10 mL) y salmuera (10 mL). Se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10% AcOEt/hexano), obteniendo el fenol **119** (313 mg, 95%) como un sólido blanco

*(4bS,8aS)-3-hydroxy-4b,8,8-trimethyl-4b,5,6,7,8,8<sup>a</sup>,9,10-octahydrophenantrene-2-carbaldehyde (119):*

$[\alpha]_D^{25} = +2.9$  (c= 2.0, CHCl<sub>3</sub>)

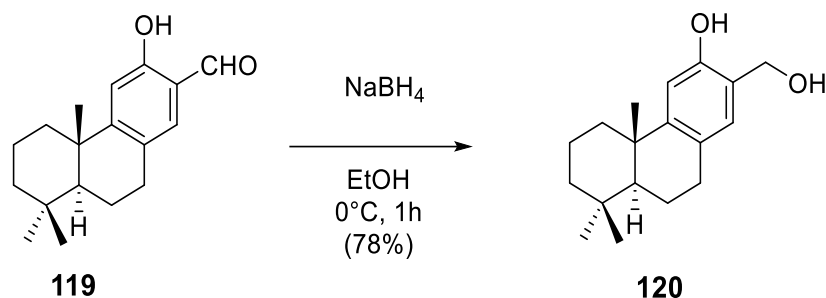
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.94 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.30 (dd, J = 11.8, 9.4 Hz, 2H), 1.53 – 1.46 (m, 2H), 1.73 – 1.63 (m, 2H), 1.94 – 1.81 (m, 2H), 2.33 – 2.24 (m, 1H), 2.97 – 2.75 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 6.87 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 10.39 (s, 1H).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 18.89 (CH<sub>2</sub>), 19.14 (CH<sub>2</sub>), 21.72 (CH<sub>3</sub>), 24.28 (CH<sub>3</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>3</sub>), 33.36 (C), 38.56 (CH<sub>2</sub>), 38.86.3 (C), 41.46 (CH<sub>2</sub>), 49.64 (CH), 112.99 (CH), 118.8 (C), 127.3 (C), 133.9 (CH), 159.36 (C), 160.84 (C), 195.91 (CHO).

**IR (film):** 711, 768, 1023, 1156, 1217, 1297, 1328, 1368, 1456, 1486, 1570, 1651, 2866, 2927 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI)** (m/z): calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>) 273.1855, found 273.1844.

## 4.4. Síntesis del 14-desmetil diol 120.



Se añade borohidruro de sodio (187 mg, 4,95 mmol) a una solución agitada de **119** (1,09 g, 3,30 mmol) en etanol (15 ml), previamente enfriada a 0°C. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, se enfría a 0°C y se agrega una solución sat. de NH<sub>4</sub>Cl (2 ml). El disolvente se elimina a vacío y el residuo obtenido se diluye con AcOEt - H<sub>2</sub>O (30:10 ml) y las fases se agitan y se separan. La fase acuosa se extrae nuevamente con AcOEt (20 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 20 ml), salmuera (20 ml), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La filtración y eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (30% de AcOEt / hexano) para aislar el compuesto **120** como un sólido blanco (145 g, 78%).

*(4bS,8aS)-2-(hydroxymethyl)-4b,8,8-trimethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydrophenanthren-3-ol (120)*

$[\alpha]_{\text{D}25} = + 20$  (c = 0.4, CHCl<sub>3</sub>).

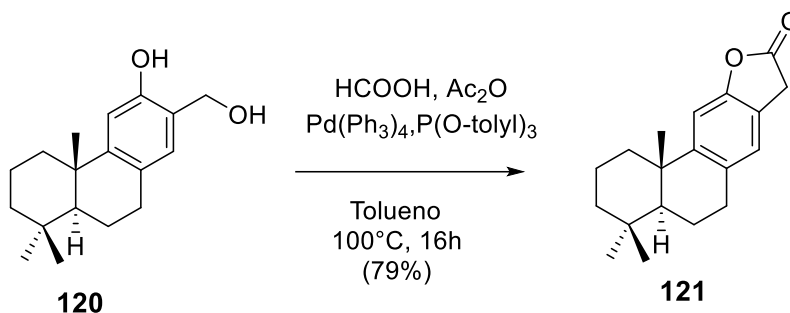
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.94 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.44 – 1.24 (m, 2H), 1.50 (dtd, *J* = 13.2, 3.3, 1.5 Hz, 2H), 1.69 (dddt, *J* = 32.2, 17.4, 10.2, 3.5 Hz, 1H), 1.88 (ddt, *J* = 12.0, 7.4, 2.3 Hz, 1H), 2.07 (s, 1H), 2.31 – 2.17 (m, 2H), 2.75 – 2.70 (m, 1H), 2.78 (dd, *J* = 11.1, 7.3 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 6.9, 2.0 Hz, 1H), 2.88 (dd, *J* = 7.1, 2.0 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.74 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125 MHz) δ (ppm): 19.12 (CH<sub>2</sub>), 19.30 (CH<sub>2</sub>), 21.66 (CH<sub>3</sub>), 24.78 (CH<sub>3</sub>), 29.53 (CH<sub>2</sub>), 33.32 (CH<sub>3</sub>), 33.49 (C), 37.84 (C), 38.83 (CH<sub>2</sub>), 41.67 (CH<sub>2</sub>), 50.13 (CH), 64.43 (CH<sub>2</sub>), 112.35 (CH), 122.13 (C), 126.79 (C), 128.22 (CH), 151.81 (C), 153.78 (C).

**IR (film):** 772, 768, 1023, 1156, 1217, 1247, 1297, 1328, 1368, 1456, 1486, 1570, 1651, 2866, 2927 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI)** (m/z): calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub> (M - H)<sup>-</sup> 273.1855, found 273.1866

#### 4.5. Carbonización catalizada del 14-desmetil diol **120**



Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (72 mg, 0.062 mmol), P (o-tolyl) 3 (82 mg, 0.27 mmol) se introducen en un tubo y se hace pasar un flujo de argón dentro del tubo durante 5 minutos. Luego, se agregó sucesivamente tolueno (1 mL), acético anhidro (492 mg, 4.82 mmol), ácido fórmico (235 mg, 5.10 mmol) y, por último, una solución de **120** (450 mg, 1.35 mmol) en tolueno (3 mL). La mezcla resultante se sella y se agita a 100 ° C durante 16 h, momento en el cual la CCF muestra la desaparición del compuesto **120**. El disolvente se evapora a vacío proporcionando un producto bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (20% AcOEt / hexano) para dar la lactona **121** como un sólido blanco (57 mg, 79%).

*(4aS,11bS)-4,4,11b-trimethyl-2,3,4,4a,5,6,8,11b-octahydrophenanthro[3,2-b]furan-9(1H)-one (121)*

$[\alpha]_{D25} = +32.1$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.96 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.23 – 1.33 (m, 3H), 1.45 – 1.54 (m, 2H), 1.85-1.62 (m, 4H), 1.90 – 1.96 (m, 1H), 2.24-2.92 (m, 1H), 3.66 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 7.03 (s, 1H).

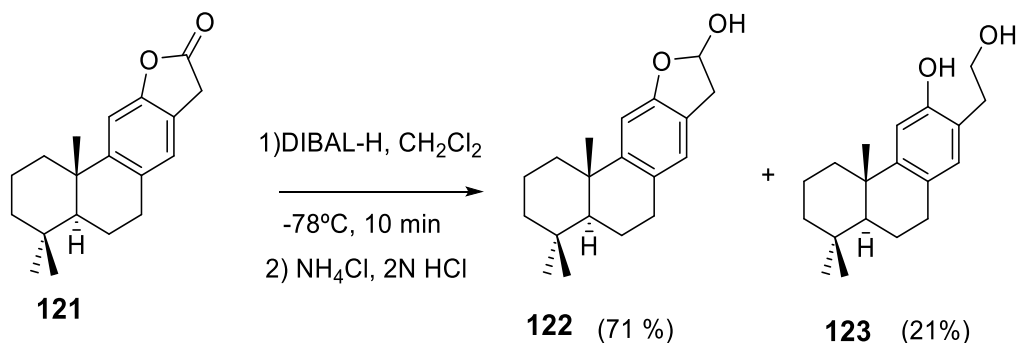
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ(ppm): 18.94 (CH<sub>2</sub>), 19.22 (CH<sub>2</sub>), 21.62 (CH<sub>3</sub>), 24.79 (CH<sub>3</sub>), 30.11 (CH<sub>2</sub>), 32.90 (CH<sub>2</sub>), 33.25 (CH<sub>3</sub>), 33.49 (C), 38.28 (C), 39.01 (CH<sub>2</sub>), 41.56 (CH<sub>2</sub>), 50.17 (CH), 106.48 (CH), 120.04 (C), 124.91 (CH), 131.04 (C), 151.40 (C), 153.20 (C), 174.75 (C).

**IR (film):** 772, 877, 896, 944, 1004, 1094, 1198, 1376, 1427, 1485, 1800, 2866, 2928, 2957 cm<sup>-1</sup>.



**HRMS (ESI)** (m/z): calcd for C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>) 285.1855, found 285.1843

#### 4.6. Síntesis del 14-desmetil lactol **122**



Se añade DIBAL-H (0,4 ml, 1 M en tolueno, 0,4 mmol) a una solución agitada de lactona **121** (113 mg, 0,379 mmol) en diclorometano seco (5 ml), previamente enfriada a -78 ° C, y la mezcla se agita durante 10 min. Luego, se añade una solución sat. de NH<sub>4</sub>Cl (2 ml) a -78 ° C y seguidamente una mezcla de AcOEt - agua (20: 5 ml). Las fases se agitan y se separan, y la fase acuosa se extrae nuevamente con AcOEt (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtraron. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, usando 20% de AcOEt / hexano como eluyente, proporcionando el lactol **122** (81 mg, 71%) y el diol **123** (24 mg, 22%) como un sirupo incoloro.

*(4aS,11bS)-4,4,7,11b-tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8,9,11b-decahydrophenanthro[3,2-b]furan-9-ol (122)*

$[\alpha]_{D25} = +16.9$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.94 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.25 – 1.35 (m, 2H), 1.45 – 1.54 (m, 1H), 1.59 – 1.75 (m, 3H), 1.78 – 1.94 (m, 2H), 2.24 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 2.30 – 2.52 (m, 2H), 2.81 (d,  $J = 8.8$  Hz, 3H), 3.96 (m, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.84 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 18.92 (CH<sub>2</sub>), 19.33 (CH<sub>2</sub>), 21.65 (CH<sub>3</sub>), 24.74 (CH<sub>3</sub>), 29.55 (CH<sub>2</sub>), 33.34 (CH<sub>3</sub>), 33.48 (C), 34.18 (CH<sub>2</sub>), 37.70 (C), 38.83 (CH<sub>2</sub>), 41.72 (CH<sub>2</sub>), 50.43 (CH), 64.79 (CH<sub>2</sub>), 77.23 (CH), 112.63 (CH), 123.73 (C), 127.21 (C), 131.21 (CH), 150.49 (C), 153.16 (C).

**IR (film):** 772, 1022, 1219, 1261, 1374, 1460, 1498, 2852, 2925, 3339 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI) (m/z):** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>) 271.2062, found 271.2061

**(4*b*S,8*a*S)-2-(2-hydroxyethyl)-1,4*b*,8,8-tetramethyl-4*b*,5,6,7,8,8*a*,9,10-octahydrophenanthren-3-ol (123)**

**[α]<sub>D</sub>25 = +9.4** (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

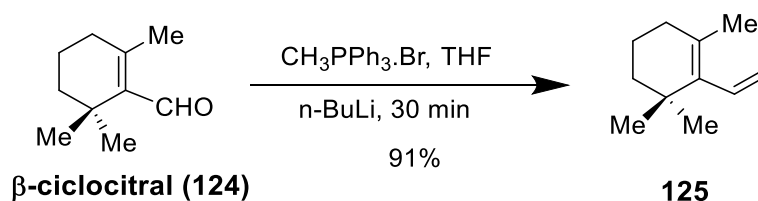
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.95 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.39 – 1.22 (m, 3H), 1.41 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 1.51 (m, 1H), 1.73 – 1.58 (m, 2H), 1.76 (dt, J = 13.7, 3.4 Hz, 1H), 1.88 (dd, J = 13.3, 7.4 Hz, 1H), 2.95 – 2.61 (m, 3H), 4.75 (s, 4H), 6.72 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 7.15 (s, 1H).

**IR (film):** 772, 1023, 1219, 1246, 1375, 1461, 1487, 1625, 1730, 2853, 2924, 3377 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 311.1987, found: 311.2000.

## 5. Procedimientos experimentales hacia análogos bi/tricíclicos de cassanos

### 5.1. Preparación del (S) -2,6-dimetilciclohex-1-eno-1-carbaldehído 125



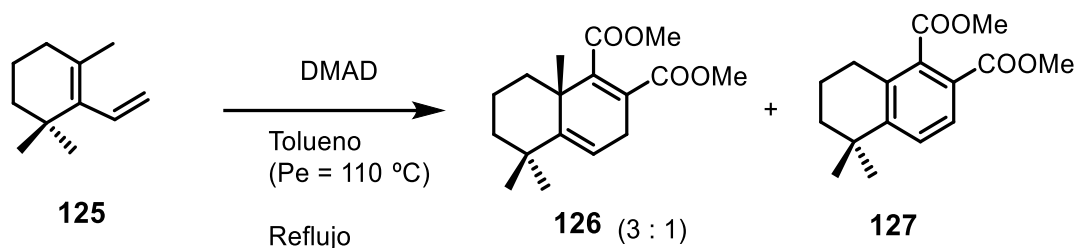
En un matraz de 100 mL se pesan 5.46 g de bromuro de metiltrifenilfosfonio (15.29 mmoles) y se le agregan 30 mL de THF. La suspensión resultante, se enfría a 0°C y luego se añade cuidadosamente 7 mL de una solución 2M en hexano de *n*-butillitio. La mezcla naranja resultante, se agita a 0°C durante 15 min. A continuación se añade 1.8 g (11.84 mmoles) de β-ciclocitral (**124**) disuelto en 10 mL de THF y la mezcla resultante se agita durante un tiempo adicional de 1 hora, comprobando mediante CCF la consumación del material de partida. La reacción se detiene mediante adición de agua (5 mL) y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido, se disuelve en diclorometano (30 mL) y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente obteniendo un crudo de reacción que se

purifica mediante una columna cromatográfica de silica gel (hexano) eluyendo el dieno **125** (1.6 g, 91%) como un aceite incoloro.

Los datos espectroscópicos del dieno (**125**) coincidieron con los datos de la literatura.<sup>40</sup>

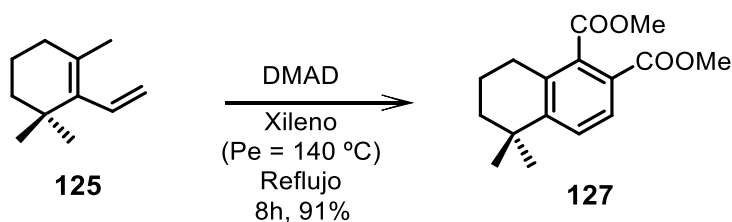
## 5.2. Estudio de la reacción de Diels-Alder del dieno **125** con DMAD

### 5.2.1. A reflujo en tolueno



Sobre una disolución del dieno **125** (200 mg, 2,29 mmoles) en tolueno (5 ml) se añade DMAD (300 mg, 6,87 mmol) y la mezcla se agita a reflujo durante 15 horas. Tras este tiempo, la CCF muestra la completa desaparición del material de partida. A continuación, la mezcla de reacción se vierte en una columna cromatográfica de gel de sílice y se eluye de forma gradual utilizando hexano y AcOEt como eluyentes. Con 5% de AcOEt/hexano se separan los dos productos de reacción.

### 5.2.2. A reflujo en xileno



Se sigue el procedimiento descrito arriba, partiendo en este caso de 120 mg del dieno **125** (0.8 mmoles), 2 mL de xileno y 140 mg de DMAD, tiempo de reacción ha sido 8 horas. Se obtiene en este caso 109 mg del aromático **127** (91%)

<sup>40</sup> Tanis SP, Abdallah YM. A Study of the Diels-Alder Regioselectivity of Substituted Vinyl Cyclohexenes. *Synth Commun.* 1986;16(3):251-9.

**Dimethyl 5,5-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-1,2-dicarboxylate (127)**

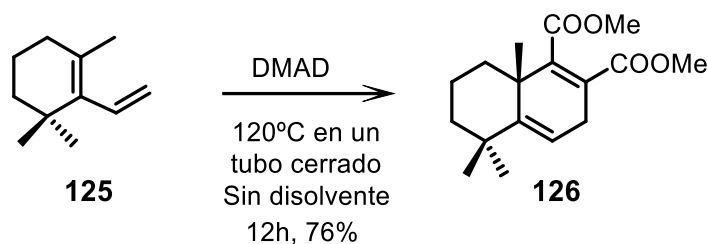
**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 2.74 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.70 – 1.65 (m, 2H), 1.31 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 170.30 (C=O), 166.17 (C=O), 151.87 (C), 135.63 (C), 133.36 (C), 127.69 (CH), 127.25 (CH), 124.31 (C), 52.45 (CH<sub>3</sub>), 52.31 (CH<sub>3</sub>), 38.21 (CH<sub>2</sub>), 34.57 (C), 31.61 (2 x CH<sub>3</sub>), 27.22 (CH<sub>2</sub>), 18.96 (CH<sub>2</sub>).

**IR (film)**: 1105, 1155, 1195, 1026, 1248, 1273, 1292, 1434, 1721, 2950 cm<sup>-1</sup>.

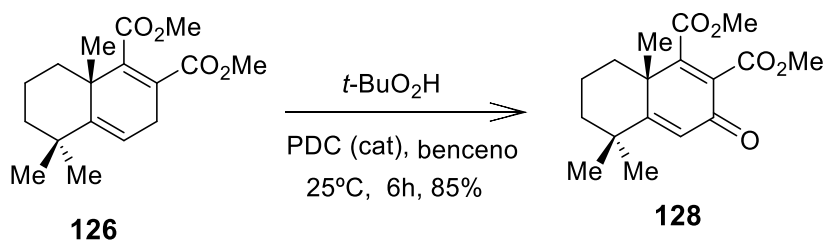
**HRMS (ESI)** m/z: calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 315.1208, found: 315.1196.

## 5.2.3. A 130°C sin disolvente



En un tubo se introducen 450 mg del dieno **125** (3 mmoles) y se le añade DMAD (1.3 g, 9 mmoles), se cierra el tubo herméticamente y se calienta a 120°C durante 12 horas. A continuación se vierte el crudo de la reacción en una columna cromatográfica (eluyente 10% AcOEt/hexano). Se obtiene en este caso el aducto **126** 342 mg (76%).

Los datos espectroscópicos de los productos **126** y **127** coincidieron con los datos de la literatura.<sup>40</sup>

**5.3. Oxidación del cicloaducto 126**

A una disolución de **126** (760 mg, 2.6 mmoles) en benceno (10 mL) se le añade hidroperóxido de *tert*-butilo en un decano 2.5 M (1.25 mL, 3.12 mmoles) y 100 mg de PDC, y la mezcla de reacción se agita durante 6 horas a 25°C. El seguimiento de la reacción mediante TLC muestra la desaparición del producto de partida y la aparición de un nuevo producto más polar. A continuación, la reacción se detiene mediante adición de una solución al 5% de NaHSO<sub>3</sub> (5 mL), con objeto de reducir el hidroperóxido que haya permanecido sin reaccionar y, se diluye la mezcla con AcOEt - H<sub>2</sub>O. Las fases se agitan y se separan. La fase orgánica recogida se lava con agua y salmuera y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y concentra para dar un producto bruto. Purificación mediante cromatografía flash en gel de silicio, eluyente 15% AcOEt/hexano, da lugar a la dienona **128** como un sólido blanco. (646 mg, 85 %).

***Dimethyl (S)-5,5,8a-trimethyl-3-oxo-3,5,6,7,8,8a-hexahydronaphthalene-1,2-dicarboxylate (128)***

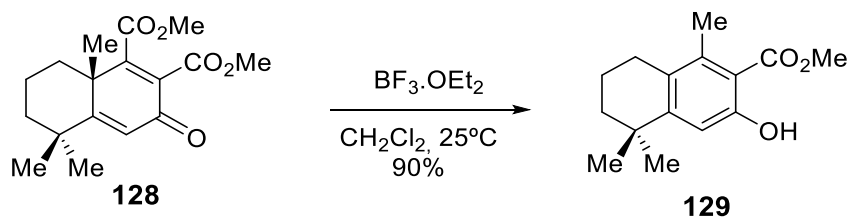
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.21 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.38 (td, *J* = 13.2, 12.5, 4.4 Hz, 1H), 1.55 (td, *J* = 13.8, 13.1, 4.3 Hz, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.62-1.67 (m, 2H), 1.98 – 1.84 (m, 2H), 3.81 (d, *J* = 11.7 Hz, 6H), 6.35 (s, 1H),

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 17.89 (CH<sub>2</sub>), 27.19 (CH<sub>3</sub>), 29.02 (CH<sub>3</sub>), 32.35 (CH<sub>3</sub>), 34.24 (CH<sub>3</sub>), 37.72 (C), 39.97 (CH<sub>2</sub>), 42.51 (C), 52.78 (CH<sub>3</sub>), 52.80(CH<sub>3</sub>), 124.41 (CH), 131.99 (C), 157.91 (C), 165.47 (C), 166.52 (C), 173.55 (C), 182.67 (C),

IR (film): 474, 572, 753, 789, 880, 919, 1026, 1068, 1098, 1148, 1201, 1250, 1368, 1388, 1434, 1657, 1702, 1734, 2950 cm<sup>-1</sup>.

HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub> (M+H<sup>+</sup>) 307.1545, found: 307.1550.

#### 5.4. Transformación de la dienona **128** en el fenol **102**



Se añade gota a gota a una solución agitada del producto **128** (319 mg, 1.04 mmoles) en diclorometano (5 ml)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (2 ml, 16,19 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se agita durante 18 h a temperatura ambiente, mediante la CCF se verificó que el producto de partida se ha consumido y en cambio aparece el supuesto fenol **129** como nuevo producto de reacción. Entonces, se diluye la mezcla con  $\text{AcOEt} - \text{H}_2\text{O}$ , las fases se agitan y se separan y la fase orgánica se lava con agua y salmuera. Después de secar la fase orgánica sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y filtrar y evaporar el disolvente, se obtiene el fenol **129** (287mg, 90%) como aceite amarillo.

**Methyl 3-hydroxy-1,5,5-trimethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carboxylate**  
(**129**)

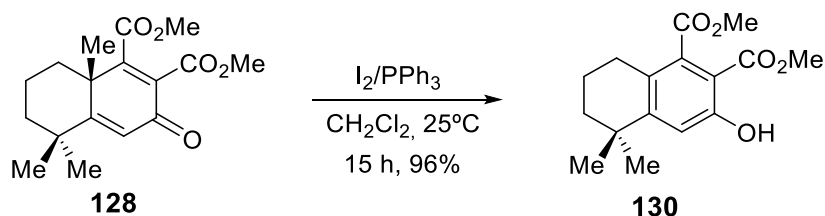
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.29 (s, 6H), 1.6-1.65(m, 2H), 1.78, 1.88 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.59 (t, J. 2H), 3.96 (s, 3H), 6.90 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 18.3 ( $\text{CH}_3$ ), 19.6 ( $\text{CH}_2$ ), 28.0 ( $\text{CH}_2$ ), 31.6 ( $2 \times \text{CH}_3$ ), 34.6(C), 38.2 ( $\text{CH}_2$ ), 52.0 ( $\text{CH}_2$ ), 111.7 (C), 112.9 (C), 127.2 (C), 138.7 (C), 153.3 (C), 158.6 (C), 171.8(C)

**IR (film)**: 558, 723, 741, 801, 867, 949, 1042, 1077, 1138, 1192, 1203, 1221, 1256, 1289, 1332, 1436, 1564, 1600, 1730, 2867, 2929  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI)** m/z: calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_3$  (M+H<sup>+</sup>) 249.1491, found: 249.1490.

### 5.5. Tratamiento de la dienona **128** con $\text{I}_2/\text{PPh}_3$



A una solución de  $\text{PPh}_3$  (90 mg, 0,34 mmol) en diclorometano (5 ml) se le añade  $\text{I}_2$  (86 mg, 0,34 mmol), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 min. Tras ello se agrega sobre una solución del producto **128** (110 mg, 0,15 mmol) en diclorometano (5 ml). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 15 h, momento en el que la CCF no muestra material de partida restante. La reacción se detiene con

NaHSO<sub>3</sub> acuoso al 10% (1 ml) y el disolvente se elimina a vacío. Luego, se añade AcOEt - agua (30: 10 ml), las fases se agitan y se separan, y la fase orgánica se lava con agua (10 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh., se filtra y se concentra para dar un producto bruto que se purifica mediante columna cromatográfica flash de gel de sílice usando 5% de AcOEt / hexano como eluyente, para dar lugar al compuesto **130** (105 mg, 96%), como un aceite incoloro.

***Dimethyl 3-hydroxy-5,5-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-1,2-dicarboxylate (130)***

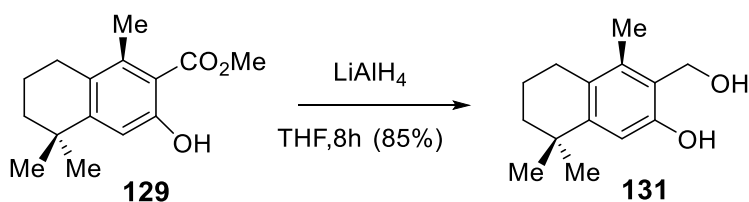
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.29 (s, 6H), 1.64 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.05 (s, 1H), 10.60 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 19.1 (CH<sub>3</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (2CH<sub>3</sub>), 34.8 (C), 38.1(CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 52.7 (CH<sub>3</sub>), 107.01 (C), 116.8 (CH), 124.5 (C), 134.8 (C), 153.3 (C), 158.9 (C), 169.1(C), 169.8(C)

IR (film): 751, 806, 1037, 1130, 1216, 1262, 1325, 1341, 1439, 1675, 1737, 2951 cm<sup>-1</sup>.

HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> Na (M+Na+) 315.1208, found: 315.1196.

### 5.6. Reducción del grupo éster del fenol **129** mediante LiAlH<sub>4</sub>



A una solución del fenol **129** (830 mg, 3.3 mmoles) en THF (10 mL), se le añade a 0°C LiAlH<sub>4</sub> (250 mg, 6.6 mmoles) y la mezcla de reacción se agita durante 15 horas. La reacción se detiene con adición de NH<sub>4</sub>Cl al 10% y después se ajusta el pH entre 3 y 4 mediante adición de una solución 2N de HCl a 0°C. A continuación se diluye la mezcla con AcOEt (30 mL) y se agitan las fases y se separan. La fase orgánica se lava con salmuera y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida para dar lugar al diol **131** (705 mg, 90%) como sirupo incoloro.

***3-(hydroxymethyl)-4,8,8-trimethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ol (131)***

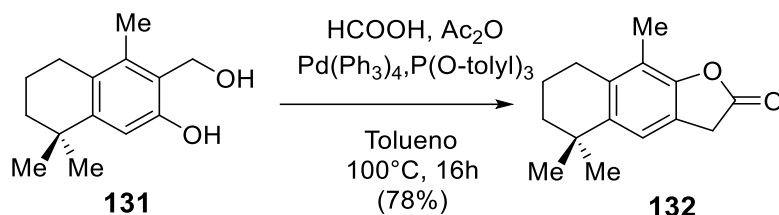
**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.27 (s, 6H), 1.6-1.63 (m, 2H), 1.82-1.8 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.57 (2H), 4.8 (s, 2H), 6.77 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 15.02 (CH<sub>3</sub>), 19.68 (CH<sub>2</sub>), 27.84 (CH<sub>2</sub>), 31.83 (2xCH<sub>3</sub>), 34.1 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 66.77 (CH<sub>2</sub>), 111.9 (C), 118.41 (C), 126.88 (C), 135.45 (C), 147.42 (C), 153.56 (C)

**IR (film)**: 559, 755, 864, 1048, 1164, 1220, 1273, 1312, 1361, 1382, 1421, 1460, 1575, 1603, 2864, 2924, 3349 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI)** m/z: calcd for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub> (M-H)<sup>-</sup> 219.1358, found: 219.1379.

### 5.7. Latonización del diol **131**: Obtención del análogo tricíclico de la taepenina F (**17**)



Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (65 mg, 0.056 mmol), P (o-tolyl)<sub>3</sub> (85 mg, 0.24 mmol), se introducen en un tubo y se pasa un flujo de argón dentro del tubo durante 3 minutos. Luego se agregan tolueno (1 ml), una solución de **131** (350 mg, 1.21 mmol) en tolueno (2 ml), acético anhidro (440 mg, 4.31 mmol) y ácido fórmico (210 mg, 4.56 mmol). La mezcla resultante se sella y se agita a 100°C durante 16 h, momento en el que la CCF muestra la desaparición del compuesto **131**. La eliminación del disolvente a vacío proporciona un producto crudo gris que se purifica por cromatografía en gel de sílice, usando AcOEt al 15% / hexano, para dar la lactona **132** como un sólido blanco (273 mg, 78%).

#### *5,5,9-trimethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphtho[2,3-b]furan-2(3H)-one (132)*

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.31 (s, 6H), 1.65-1.68 (m, 2H), 1.83-1.89 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.60-2.63 (m, 2H), 3.62 (s, 2H), 6.99 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 16.51 (CH<sub>3</sub>), 31.98 (2xCH<sub>3</sub>), 106.10 (CH), 19.30 (CH<sub>2</sub>), 27.38 (CH<sub>2</sub>), 32.53 (CH<sub>2</sub>), 38.47 (CH<sub>2</sub>), 34.61 (c), 34.61 (c), 65.88 (c), 119.73 (c), 130.30 (c), 132.76 (c), 174.71 (c).



**IR (film):** 773, 879, 937, 1012, 1127, 1151, 1165, 1213, 1361, 1380, 1420, 1469, 1621, 1728, 1815, 2855, 2938  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI) m/z:** calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_2$  (M+H<sup>+</sup>) 231.1385, found: 231.1374

**CAPÍTULO II.**  
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD**  
**BIOLÓGICA**



# INTRODUCCIÓN

## 1. Generalidades sobre el cáncer

### 1.1. ¿Qué es el cáncer?

El cáncer es una enfermedad en la cual células, originariamente sanas, se transforman en células que presentan una división celular anormal y una proliferación descontrolada<sup>41</sup>. Con el avance de la enfermedad estas células cancerígenas se van extendiendo por el órgano y los tejidos adyacentes (extensión local), alcanzan los ganglios linfáticos (infiltración linfática) o se introducen en los vasos sanguíneos y finalmente colonizan otros órganos distantes (metástasis).

Las células tumorales son células que han perdido el control en los procesos de crecimiento y división y presentan una tasa de crecimiento alta; para su mantenimiento utilizan nutrientes, que permiten la generación de los precursores necesarios para seguir dividiéndose, lo que da lugar a una masa tumoral que invade los tejidos circundantes rompiendo las membranas límites de las distintas estructuras.<sup>42</sup> La división descontrolada de estas células es más rápida que la de las sanas y es la causa de un nódulo o protuberancia (angiogénesis) en la mayoría de los cánceres, y termina invadiendo otros tejidos y difundiéndose hacia otras partes del cuerpo y órganos impidiendo su normal funcionamiento<sup>43</sup>, lo que provoca, cuando la enfermedad se encuentra extendida, fallo multiorgánico y la muerte del paciente. Las capacidades atípicas que adquieren a estas células su irregular proliferación y sobrevivencia, están debidas a un desbalance entre aquellos genes que las promueven (Oncogene) y los que las suprimen (supresores de tumores). Mutaciones y modificaciones en el nivel de expresión de ellos (regulación epigenética) llevan a la transformación de una célula normal en una maligna.<sup>44</sup>

---

<sup>41</sup> Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003;103(3):645–62.

<sup>42</sup> Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307–20.

<sup>43</sup> A) Roy D, Sheng GY, Herve S, Carvalho E, Mahanty A, Yuan S, et al. Interplay between cancer cell cycle and metabolism: Challenges, targets and therapeutic opportunities. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:288–96. B) Salem H, Attiya G, El-Fishawy N. Classification of human cancer diseases by gene expression profiles. *Appl Soft Comput J.* 2017;50:124–34.

<sup>44</sup> Weinberg RA. Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989;49(14):3713–21.

Las células tumorales también pueden presentar alteraciones en sus membranas (proteínas transmembrana, receptores, etc.<sup>45</sup> y ciclos celulares (división rápida)<sup>46</sup>

No obstante, todos los tumores poseen aberraciones y propiedades comunes en la regulación de vías de señalización que controlan la proliferación celular y sobrevivencia. En el año 2000, Hanahan y Weinberg simplificaron estas características afines a todos ellos en seis, a saber: Capacidad y microambiente de las células que forman el tumor para producir señales de proliferación continuamente, Capacidad de evitar la apoptosis, Aumento de señales anticrecimiento, Inducción de angiogénesis, Invasión de tejidos y metástasis, Potencial ilimitado de crecimiento,<sup>47</sup> Desregulación energética celular, Mutación e inestabilidad del genoma, Evasión de destrucción por el sistema inmune, Inflamación promovida por el tumor.<sup>48</sup>

El término “cáncer” engloba más de 150 tipos de enfermedades atendiendo a su origen. Así pues, hablamos de carcinomas cuando se producen en epitelios y/o mucosas, sarcomas en tejido conjuntivo, leucemias provenientes de médula ósea, linfomas y mielomas derivados del sistema inmunitario, osteomas en hueso y otros derivados del sistema nervioso central.<sup>49</sup>

## 1.2. Incidencia y clasificación

El cáncer presenta una gran incidencia y ya es la segunda causa principal de muerte a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2018 causó 9,6 millones de muertes, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer. Estas tasas podrían aumentar en un 50% para 15 millones de casos nuevos en el año 2020, según el Informe mundial sobre el cáncer, publicado el 3 de abril por la OMS y la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC). Se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1,76 millones de

<sup>45</sup> Maldonado CR, Salassa L, Gomez-Blanco N, Mareque-Rivas JC. Nano-functionalization of metal complexes for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord Chem Rev.* 2013;257(19–20):2668–88.

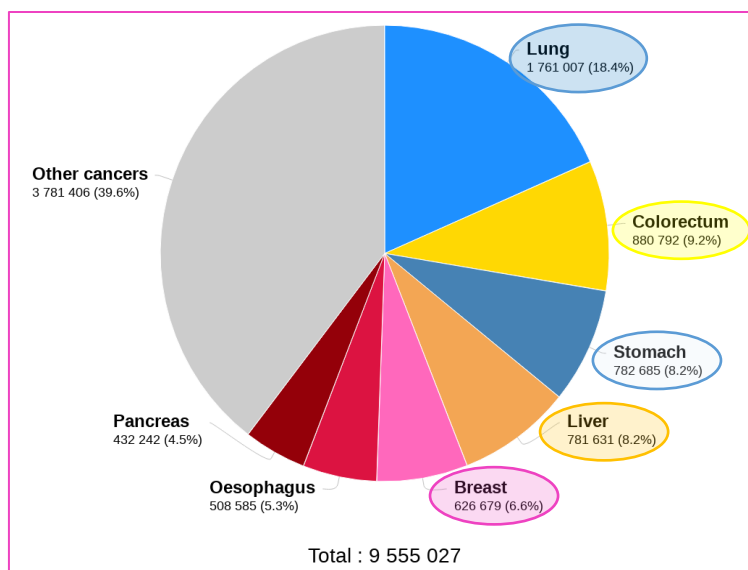
<sup>46</sup> Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. 84 Nat nanotech 2007 R Langer Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2:751–60.

<sup>47</sup> Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573–84.

<sup>48</sup> a) Hall MD, Mellor HR, Callaghan R, Hambley TW. Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J Med Chem.* 2007;50(15):3403–11. b) Graf N, Lippard SJ. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(11):993–1004.

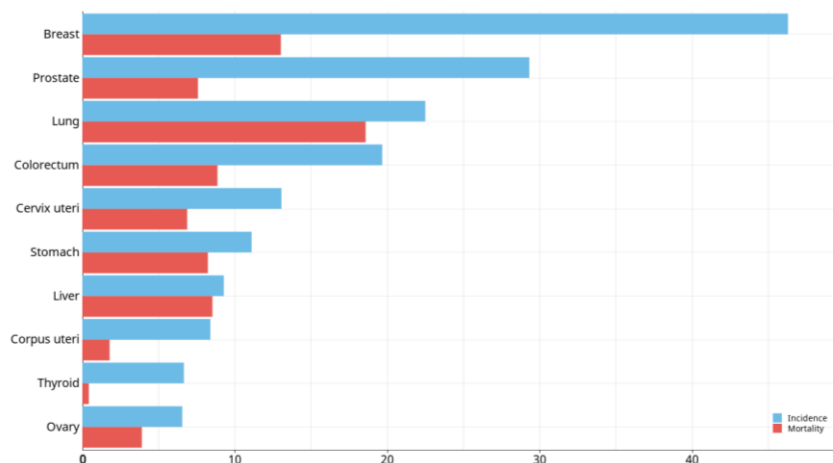
<sup>49</sup> Salem H, Attiya G, El-Fishawy N. Classification of human cancer diseases by gene expression profiles. *Appl Soft Comput J.* 2017;50:124–34.

mueres), cáncer colorrectal (880.000 muertes), cáncer de estómago (783.000 muertes), cáncer de Hígado (782.000 defunciones) y de mama (627.000 muertes) (OMS, 2018). (Fig.3)



**Figura 3.** Mortalidad según el tipo de cáncer (Mundialmente, ambos sexos todas edades) (GLOBOCAN 2018. International Agency for Research on Cancer; 2018).

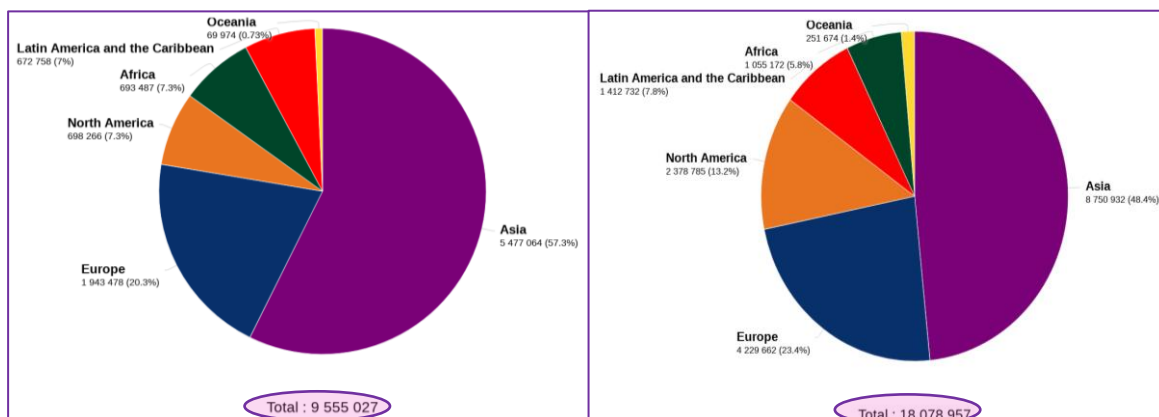
En la Figura 4 se recogen algunos datos relevantes respecto a los diferentes tipos de cánceres diagnosticados en 2018, según la (IARC).



**Figura 4.** Incidencia y mortalidad de cáncer, según la edad (Mundialmente, ambos sexos). (GLOBOCAN 2018. International Agency for Research on Cancer; 2018).<sup>50</sup>

<sup>50</sup> IARC G. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, females, all ages. Cancer Today . 2018;2018. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>

Mientras que en la Figura 5 se recogen otras estadísticas respecto a de cánceres números de muertes y los nuevos casos diagnosticados en 2018, según la (IARC).



**Figura 5.** Número estimado de muertes (Derecha) / de nuevos casos (Izquierda) con cáncer por cada continente (ambos sexos, todas edades). (GLOBOCAN 2018. International Agency for Research on Cancer; 2018).<sup>50</sup>

La OMS destaca 7 principales hechos claves relacionados a la mortalidad causada por el cáncer:

La mayoría de los cánceres tienen su origen en agentes externos, tales como el medio ambiente o el estilo de vida. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se deben a los 5 principales riesgos conductuales y dietéticos: alto índice de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco (casi el 22% se debe a esto) y como consecuencia de infecciones como la hepatitis y el virus del papiloma humano (VPH) (alrededor del 25%).

Aproximadamente el 70% de las muertes por cáncer ocurren en estos países debido a La presentación en etapa tardía y el diagnóstico y tratamiento inaccesibles son comunes.<sup>51</sup>. En 2017, solo el 26% de los países de bajos ingresos informaron tener servicios de patología generalmente disponibles en el sector público. Más del 90% de los países de ingresos altos informaron que los servicios de tratamiento están disponibles en comparación con menos del 30% de los países de ingresos bajos.

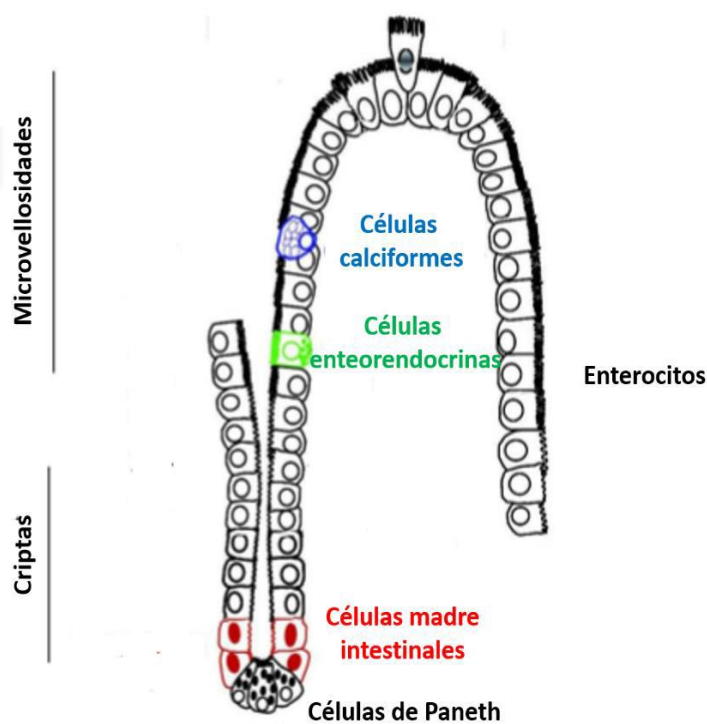
<sup>51</sup> Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* . 2016;4(9):e609–16.



### 1.3. Cáncer colorrectal

#### 1.3.1. Epitelio Intestinal

El epitelio intestinal desempeña varias funciones cruciales, entre ellas: actúa como barrera previniendo la entrada al organismo de sustancias nocivas, es el responsable de la absorción de nutrientes, agua y electrolitos del lumen intestinal e interactúa con la microbiota local contribuyendo a la modulación del sistema inmune y a la defensa frente a microorganismos patógenos. Alteraciones en la funcionalidad de este tejido pueden llevar al desarrollo de varios desórdenes, como procesos inflamatorios, infecciones, diabetes o cáncer .<sup>52</sup>



**Figura 6.** Linajes celulares del epitelio intestinal.

El epitelio intestinal consiste en cuatro linajes celulares principales que surgen de un progenitor de células madre pluripotentes. Éstos incluyen los enterocitos, que conforman

<sup>52</sup> a) Fantini M, Pallone F. Cytokines: From Gut Inflammation to Colorectal Cancer. *Curr Drug Targets*. 2008;9(5):375–80. b). González-Castro AM, Martínez C, Salvo-Romero E, Fortea M, Pardo-Camacho C, Pérez-Berezo T, Alonso-Cotoner C, Santos J, Vicario M. Mucosal pathobiology and molecular signature of epithelial barrier dysfunction in the small intestine in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(1):53–63. c) Jurjus A, Eid A, Al Kattar S, Zeenny MN, Gerges-Geagea A, Haydar H, Hilal A, Oueidat D, Matar M, Tawilah J, Hussein IH. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA Clin*. 2016;5(2016):16–24.

la mayoría de las células epiteliales intestinales, las células caliciformes que producen mucus, las células enteroendócrinas, que producen hormonas especializadas en el aparato gastrointestinal, y las células de Paneth, que son las principales productoras de péptidos antimicrobianos<sup>53</sup> ( Fig.6). Entre los modelos in vitro que emplean el cultivo de células de epitelio intestinal humano más ampliamente usados se encuentra la línea celular HT-29. (Sección experimental)

### 1.3.2. Factores de riesgo del CCR

Según informó la OMS a través del proyecto Globocan, en 2018, el cáncer colorrectal CCR es el tercer tipo de cáncer más común diagnosticado (1 849 518 = 10.2%) y el segundo más mortal (880 792 = 9.2%) a nivel mundial. Es una enfermedad multifactorial, que se desarrolla tanto por causas genéticas como por causas ambientales.

Atendiendo a su presentación, se conocen dos formas fundamentales de cáncer colorrectal: esporádico y hereditario. Menos del 5% de los casos del CCR surgen en individuos con predisposición genética adquirida, por lo que la mayoría de los tumores colorrectales (70-85 %) no son derivados de una genética heredada, sino que se engloban dentro de los cánceres de tipo esporádico<sup>54</sup>. Además, entre un 10 y un 30% de los pacientes presentan un historial familiar de cáncer colorrectal cuyas causas genéticas aún no están caracterizados completamente <sup>55</sup>

Los principales factores que incrementan el riesgo de padecer el CCR son los siguientes:

1. Alimentación: Las dietas ricas en grasas animales (carnes rojas) y pobres en fibra.
2. Actividad física: Una vida sedentaria favorece el riesgo de aparición de esta enfermedad.
3. Edad: El riesgo de padecer la enfermedad se incrementa con la edad, ya que aumenta la aparición de pólipos en el colon y el recto.

---

<sup>53</sup>Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2012;3(1):27.

<sup>54</sup> Mason JB, Tang SY. Folate status and colorectal cancer risk: A 2016 update. *Mol Aspects Med.* 2017;53:73–9.

<sup>55</sup> Jaspersen KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2044–58

4. Consumo de tabaco y alcohol: El tabaco aumenta el riesgo de padecer pólipos, que como se ha mencionado anteriormente, suelen ser los precursores del CCR. Esta relación es consecuencia de la elevada concentración de agentes carcinogénicos presentes en el humo del tabaco<sup>56</sup>. Igualmente, existen evidencias de que el alcohol actúa favoreciendo el crecimiento de las células de la mucosa del colon, dando lugar a la aparición de pólipos.
5. Historia personal de pólipos: La aparición de pólipos adenomatosos aumenta el riesgo de padecer CCR.
6. Historia personal de CCR: Las personas diagnosticadas de CCR poseen un mayor riesgo de padecer un segundo tumor en el colon o el recto.
7. Enfermedades inflamatorias intestinales: Suponen menos del 1% de todos los CCRs. Los dos tipos principales de enfermedades inflamatorias a este nivel son la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. La colitis ulcerosa es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación prolongada de las paredes del colon, mientras que la enfermedad de Crohn afecta generalmente al intestino delgado, aunque en ocasiones el colon también se encuentra afectado.
8. Antecedentes familiares. En un 5% de los cánceres de colon se han identificado una serie de genes, cuya alteración da lugar a síndromes que predisponen, en mayor o menor grado, a la aparición de CCR. Los dos más importantes son la poliposis colónica familiar y el CCR hereditario no polipósico <sup>57, 68</sup>

### 1.3.3. Clasificación del CCR:

Desde su establecimiento por Dukes <sup>58</sup> en la primera mitad del siglo XX el sistema de clasificación de los tumores colorrectales ha tenido siempre como referencia la extensión anatómica de los mismos. Así, para estos tumores, los tres parámetros fundamentales del método TNM se definen como:

---

<sup>56</sup> Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clin Colorectal Cancer* . 2016;15(3):195–203.

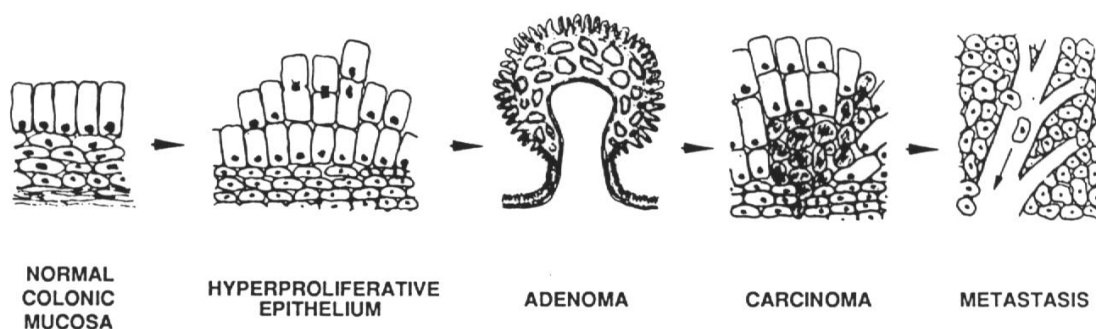
<sup>57</sup> Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18151–64.

<sup>58</sup> Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35:323–32.

- ◆ Extensión (T). Indica el grado de infiltración tumoral en la pared del intestino grueso.
- ◆ Ganglios afectados (N). Indica si el tumor se ha extendido a ganglios situados en las proximidades del tumor.
- ◆ Metástasis (M). Indica si ha existido invasión de otros órganos por parte del tumor

La transformación tumoral se inicia en la mucosa colónica a nivel de las criptas. Durante la progresión tumoral, la mayoría de los CCRs aparecen sobre un pólipo existente en la mucosa del colon y recto <sup>68</sup>, dichos pólipos son crecimientos anormales de tejido, generalmente benignos, que surgen de la capa interior o mucosa del intestino hacia la luz intestinal, y que algunos, por diversas circunstancias, evolucionan a tumor maligno. Se estima que entre el 60 y 80% de los CCRs se desarrollan a partir de un adenoma o pólipo adenomatoso, los llamados adenocarcinomas. Los demás se desarrollan directamente a partir de un tumor benigno detectable<sup>59</sup>

El adenoma es una neoplasia benigna que tiene lugar en las criptas colónicas, caracterizada por una actividad mitótica continua, donde las células no se diferencian, de manera que el compartimento proliferativo puede llegar a ocupar la cripta completa. Por su parte, dentro de los tipos histológicos de CCR, los adenocarcinomas son los más frecuentes, y se pueden clasificar en tres grados: bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. (Fig.7)



**Figura7.** Representación de la carcinogénesis colorrectal <sup>60</sup>

<sup>59</sup> Lafay L, Ancellin R. Alimentation et cancer colorectal. *Cah Nutr Diet.* 2015;50(5):262–70.

<sup>60</sup> Kinzler KW VB. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87:159–70.

### 1.3.4. Terapia del CCR

Para el tratamiento del CCR se sigue un protocolo que recoge las indicaciones o limitaciones de tratamiento, en función de una serie de factores: el estado general del paciente, la localización del tumor y, en la fase en la que se encuentra la enfermedad, infiltración en la pared del colon o recto, afectación ganglionar, afectación de órganos próximos y diseminación de la enfermedad. Es muy importante tener en cuenta la existencia de otras enfermedades que puedan dificultar la realización de algún tratamiento específico en los pacientes que padecen cáncer colorrectal. Los tratamientos empleados con mayor frecuencia en el tratamiento del CCR son la cirugía y la quimioterapia y depende del estadio de la enfermedad:

- ◆ En el estadio A el tratamiento es solamente quirúrgico.
- ◆ En el estadio B la cirugía puede ser el único tratamiento, pero los pacientes con factores de mal pronóstico se benefician de una quimioterapia adyuvante o complementaria a la cirugía.
- ◆ En el estadio C el tratamiento quirúrgico es insuficiente para la curación de la enfermedad y se debe realizar una quimioterapia adyuvante en todos los casos, salvo contraindicaciones médicas.
- ◆ En el estadio D la quimioterapia es el tratamiento principal. Además, si es posible llevar a cabo una resección quirúrgica completa de las metástasis, la supervivencia del paciente se prolonga de forma significativa

## 1.4. Cáncer del hígado

### 1.4.1. El hígado

El hígado es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano, ya que desempeña un papel central en el metabolismo y proporciona a los demás órganos y tejidos una mezcla adecuada de nutrientes a través del torrente circulatorio. Entre otras muchas funciones esenciales en las que participa, podemos destacar la homeostasis corporal, la producción y secreción de la bilis, síntesis de numerosas proteínas (de coagulación, de fase aguda de la inflamación, de respuesta inmune,...), el almacenaje de glucógeno, vitaminas y minerales, así como la detoxificación y metabolización de sustancias tóxicas.

A) Estructuras hepáticas

Al microscopio, pueden distinguirse las siguientes estructuras básicas que conforman el tejido hepático:

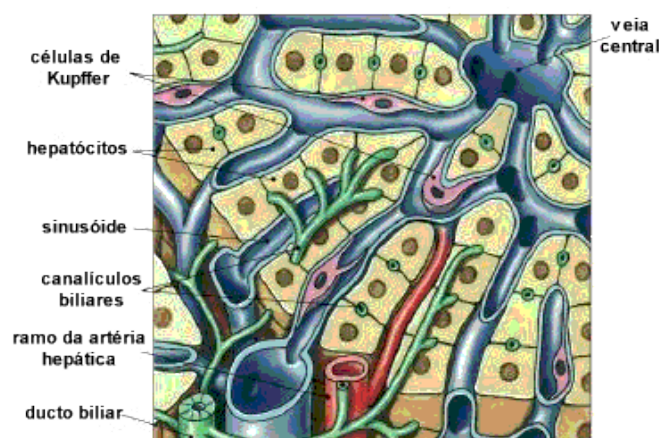
1) *Parénquima hepático*: está compuesto por una estructura que puede representarse funcionalmente en dos modelos distintos, denominados lobulillo y acino hepáticos, en el lobulillo hepático la vena centrolobulillar o central se localiza en el centro de la estructura, mientras que en el acino hepático es la tríada hepática o portal (constituida por la arteriola portal, la vena portal y el conducto biliar)

2) *Sinusoides hepáticos*: son capilares que se disponen entre las láminas de hepatocitos (el tipo celular mayoritario) y donde confluyen, desde la periferia de los lobulillos, las ramas de la arteria hepática y de la vena porta.

3) *Espacio de Disse*: es un estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos.

B) Tipos celulares hepáticos

El hígado está constituido por células parenquimales o hepatocitos, que representan entre el 60-80% de la masa hepática, y células no parenquimales, donde se engloban las células endoteliales, células de Kupffer (macrófagos residentes hepáticos), células estrelladas (adipocitos), células endoteliales biliares (colangiocitos), células madre u ovales y células de Pit (linfocitos natural killer hepáticos) (Fig. 8). Esta variabilidad celular explica las diferentes funciones fisiológicas del hígado.



**Figura 8.** Composición celular del hígado

Entre las diferentes líneas tumorales del carcinoma hepatocelular (CHC) de origen humano, la línea HepG2 conserva muchas de las funciones metabólicas propias del hígado<sup>61</sup>, y es utilizada como modelo in vitro en una gran variedad de estudios relacionados con los procesos de carcinogénesis, toxicología, diferenciación celular, etc.<sup>62</sup> (Más detalles en sección experimental)

#### 1.4.2. Factores de riesgo del cáncer de hígado

Como se mencionó con anterioridad, en 2018, la OMS indicó que los tumores hepáticos ocupan a nivel mundial el sexto lugar en cuanto a frecuencia se refiere (841 080 = 4.7%) y el cuarto lugar en relación con la mortalidad (781 631 =8.2%) tumoral respecto al resto de tipos tumorales, lo que indica su importancia desde el punto de vista clínico. En toda la literatura, el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) se consideran como los principales factores de riesgo para el desarrollo de un hepatocarcinoma. De hecho, más del 80% de los hepatocarcinomas mundiales se atribuyen al VHB y VHC .<sup>63</sup>

Otros factores de riesgo incluyen el consumo excesivo de alcohol, cirrosis, esteatosis hepática, hepatitis autoinmunes, cirrosis biliar primaria, exposición a carcinógenos medioambiental, fundamentalmente la aflatoxina B, y la presencia de enfermedades metabólicas producidas por alteraciones genéticas, como la hemocromatosis hereditaria, tiroxinemia, déficit de  $\alpha$ 1-antitripsina <sup>64</sup>. Algunos de los principales mecanismos propuestos como responsables de la progresión de la enfermedad tumoral hepática incluyen la regeneración hepática persistente (numerosos ciclos de muerte y proliferación celular alternos) <sup>65</sup> o la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno

---

<sup>61</sup> Javitt NB. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal*. 1990;4(2):161–8.

<sup>62</sup> Stier H, Fahimi HD, Van Veldhoven PP, Mannaerts GP, Völkl A, Baumgart E. Maturation of peroxisomes in differentiating human hepatoblastoma cells (HepG2): Possible involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ). *Differentiation*. 1998;64(1):55–66.

<sup>63</sup> a) Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529–38. b) Anzola M. Hepatocellular carcinoma: Role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat*. 2004;11(5):383–93

<sup>64</sup> Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. In *Seminars in liver disease* 2005 May (Vol. 25, No. 02, pp. 212-225). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA..

<sup>65</sup> Kitamura T, Watanabe S, Sato N. Liver regeneration, liver cancers and cyclins. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13(SUPPL.):96–9.

(ERN), relacionada esta última con una reducida capacidad antioxidante del órgano y el incremento de la peroxidación lipídica

### 1.4.3. Clasificación del cáncer de hígado

Los tumores hepáticos descritos, se han agrupado en los siguientes grupos histológicos:

- ◆ *Adenocarcinoma*: El cistoadenocarcinoma es una neoplasia quística maligna del epitelio biliar poco frecuente, cuya incidencia es del 0,4% y cuyo origen es intrahepático en el 97% de los casos.
- ◆ El *carcinoma epidermoide* de hígado es un tumor muy raro, de hecho únicamente se han publicado hasta el momento <sup>66</sup> casos en la literatura, habiéndose descrito el primero de ellos en 1934.
- ◆ El *sarcoma* embrionario indiferenciado del hígado es un tumor hepático de origen mesenquimal, poco frecuente en la edad pediátrica y los casos en adultos son raros.
- ◆ El *leiomiocarcinoma* hepático es un tumor maligno mesenquimal de origen miogénico que aparece raramente en el hígado. Generalmente se han descrito en niños que presentan el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido y el virus de Epstein Barr.
- ◆ El *colangiocarcinoma* es un tumor maligno poco frecuente que se origina del epitelio ductal del árbol biliar intrahepático y se presenta especialmente después de la sexta década de la vida .<sup>67</sup>
- ◆ El *hepatocarcinoma* o *carcinoma hepatocelular* (CHC) resulta de una alteración patológica de los procesos de proliferación y muerte celular en los hepatocitos y representa más del 90% del cáncer de hígado primario <sup>68</sup>

---

<sup>66</sup> Thomas MB, Abbruzzese JL. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):8093–108.

<sup>67</sup> a) Ross JS, Del Rosario A, Bui HX, Sonbati H SO. Primary hepatic leiomyosarcoma in a child with the acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol*. 1992;23(1):69-72. b) Brichard B, Smets F, Sokal E, Clapuyt P, Vermynen C, Cornu G, Rahier J, Otte JB.. Unusual evolution of an Epstein-Barr virus-associated leiomyosarcoma occurring after liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2001;5(5):365–9.

<sup>68</sup> a) Kirimlioglu H, Dvorchick I, Ruppert K, Finkelstein S, Marsh JW, Iwatsuki S, Bonham A, Carr B, Nalesnik M, Michalopoulos G, Starzl T. Hepatocellular carcinomas in native livers from patients treated with orthotopic liver transplantation: Biologic and therapeutic implications. *Hepatology*. 2001;34(3):502–10. b) Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):235–42. c) Hui AM, Makuuchi M. Molecular basis of multistep hepatocarcinogenesis: Genetic and epigenetic events. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34(8):737–42.



- ◆ El *hepatoblastoma* es el tumor primario hepático más común en la infancia y adolescencia. La razón de sexo para el hepatoblastoma es, aproximadamente, 2:1 y, generalmente, se asocia con distintas anomalías congénitas, como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Down, poliposis colónica familiar, malformaciones renales y cardíacas y nefroblastomas, entre otras.<sup>69</sup>
- ◆ La *trombosis* de la vena porta ocurre en una alta proporción de pacientes con enfermedad avanzada y con frecuencia es menor en hepatocarcinomas de tamaño pequeño.<sup>70</sup>

### 1.4.4. Terapia del cáncer de hígado:

El CHC implica un reto terapéutico por múltiples razones: es un tumor altamente vascularizado, cuyo estándar de tratamiento es la resección quirúrgica; pero que en un alto número de casos se presenta en enfermos con una pobre reserva hepática lo cual dificulta aún más su manejo.

La resección quirúrgica continúa siendo el estándar de oro en el tratamiento de los pacientes con HCC. La extensión de la resección hepática va a depender de la localización del tumor y de la reserva funcional del paciente. A su vez, la técnica quirúrgica está basada en los segmentos hepáticos que van a ser resecados<sup>71</sup>

La embolización de la vena porta tiene como objetivos la atrofia del lóbulo embolizado y la hipertrofia del lóbulo no embolizado con el fin de disminuir el riesgo de fallo hepático en el postoperatorio de una resección hepática mayor.<sup>72</sup>

---

<sup>69</sup> a) Giardiello FM, Offerhaus GJ, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Mulder JW, Kelley CN, Hamilton SR. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *J Pediatr.* 1991;119(5):766-8. b) Lynch HT, Thorson AG, McComb RD, Franklin BA, Tinley ST, Lynch JF. Familial adenomatous polyposis and extracolonic cancer. *Dig Dis Sci.* 2001;46(11):2325-32.

<sup>70</sup> a) Albacete RA, Matthews MJ, Saini N. Portal vein thromboses in malignant hepatoma. *Ann Intern Med.* 1967;67(2):337-48. b) Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, Lin ZY, Ma ZC, Ye SL, Wu ZQ, Fan J, Qin LX, Zheng BH. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2001;91(8):1479-86.

<sup>71</sup> Liau KH, Blumgart LH, DeMatteo RP. Segment-oriented approach to liver resection. *Surg Clin North Am.* 2004;84(2):543-61.

<sup>72</sup> Kokudo N, Makuuchi M. Current role of portal vein embolization/hepatic artery chemoembolization. *Surg Clin North Am.* 2004;84(2):643-57.

El trasplante o hepatectomía total ha sido estudiada en importantes centros de trasplante en el manejo de los pacientes con HCC. En general se siguen los criterios de Milán para la selección de los pacientes, aunque en algunos centros se han extendido estos criterios.

La ablación con radiofrecuencia. Su mecanismo de acción es la destrucción de las células tumorales por el aumento de la temperatura que produce la radiofrecuencia a través de una sonda especial con distintos electrodos que destruyen las células cancerosas.<sup>73</sup>

La inyección percutánea de alcohol se emplea frente a un tumor hepático (primario o secundario) en un estadio precoz cuando su tamaño es pequeño y no hay síntomas; junto a las terapias clásicas, la alcoholización percutánea se ha convertido en una alternativa terapéutica reconocida desde 1986.<sup>74</sup>

### 1.5. Cáncer de piel

#### 1.5.1. La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, con una superficie entre 2-3 m<sup>2</sup>. Tiene una estructura relativamente compleja que le permite realizar múltiples funciones. La arquitectura de la piel es estratificada y se distinguen tres capas principales, desde la superficie a la profundidad: la epidermis, que es la más superficial; la dermis, que es una capa intermedia y la hipodermis, que es la más profunda. Cada capa contiene diferentes tipos de células que juegan una función diferente.<sup>75</sup>

#### 1.5.2. Epidermis

De acuerdo con A.A. Cordero, la epidermis presenta una estructura estratificada y no vascularizada, que está constantemente en renovación. De la superficie a la profundidad encontramos las siguientes capas de la epidermis: córnea, granulosa, espinosa y basal. La capa córnea está formada por los corneocitos que son células grandes muy aplanadas y sin núcleo, sin orgánulos citoplasmáticos y muertas. Por debajo de la capa córnea se encuentra la capa granulosa que está formada por células granulares vivas y menos

---

<sup>73</sup> Strasberg S, Linehan D. Radiofrequency ablation of liver tumors. *Curr Probl Surg*. 2003;40(8):459–98.

<sup>74</sup> Livraghi T, Bolondi L, Lazzaroni S, Marin G, Morabito A, Rapaccini GL, Salmi A, Torzilli G. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A study on 207 patients. *Cancer*. 1992 Feb 15;69(4):925-9.

<sup>75</sup> a) Alejandro A. Cordero. *Biología de la Piel. Estructura y Funciones*. In: Edición MPR de la primera, editor. 1997. p. 1–110. b) Ackerman AB. Histologic diagnosis of inflammatory skin disease. *An Algorithmic Method Based On Pattern Analysis*. 2005;3:289-337.

aplanadas que los corneocitos. La capa espinosa está formada por células con forma de poliedros que están unidas entre sí por puentes celulares que confieren a su superficie un aspecto espinoso. La capa basal o germinativa está constituida por una sola fila de células cilíndricas que asientan sobre la membrana basal o unión dermo-epidérmica. En la capa basal coexisten cuatro tipos de células: el queratinocito (90%), el melanocito (5%), la célula de Langerhans (3-5%) y la célula de Merkel (<0.1%)<sup>75</sup>

### A) Dermis

La dermis es una capa altamente vascularizada y nutre a la epidermis. Su espesor es variable de 1-4 mm según las regiones corporales. No tiene estructura de capas de células superpuestas, como en la epidermis, sino de un complicado sistema de fibras entrelazadas embebidas de una sustancia denominada "sustancia fundamental amorfa". Esta sustancia está constituida de un material (agua, electrolitos, proteínas plasmáticas, y mucopolisacáridos) que llena los espacios entre las fibras y células de la dermis. Las células que forman principalmente la dermis se denominan fibroblastos, constituyendo dos tipos de fibras: colágenas y elásticas.

### B) Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo como también se le conoce, es un tejido conjuntivo laxo constituido por grandes lóbulos de tejido graso, limitados por tabiques de fibras colágenas delgadas y escasas fibras elásticas. El adipocito o célula grasa, es el elemento básico de esta capa, siendo una línea especial de células conectivas. Las células grasas están organizadas en lobulillos de aproximadamente 1 cm de diámetro separados por tabiques de tejido conectivo, en su mayoría verticales. Los microlóbulos, que son subdivisiones de los lobulillos, a su vez están rodeados por tabiques más finos de fibras colágenas.

### 1.5.3. Factores de riesgo del cáncer de piel

La incidencia del cáncer de piel ha aumentado durante las últimas décadas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de piel se constituye como la neoplasia maligna más frecuente en EE. UU. y en muchos otros países del mundo.<sup>76</sup>

---

<sup>76</sup> a) Gómez Vital MN, Orihuela de la Cal JL, Ortega Romero L. Morbilidad por cáncer de piel. *Rev Cuba Med Gen Integr* . 2000;16(2):125–8. b) Roby L, Tony M, Wayne S, Bruce A. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. *World Heal Organ Public Heal Environ* .

Según la OMS, en 2018, el número total de casos de cáncer de piel melanoma ronda los 287 723 y causó alrededor de 57 043 muertes. Mientras que del cáncer de piel no melanoma ocupó mundialmente en el mismo año el tercer lugar con una frecuencia de 1 042 056 (6.2%) de casos nuevos, y provocó 65 155 de defunciones.<sup>77</sup>

El cáncer de piel se difiere de otros tumores en los siguientes aspectos: Es prevenible, su localización en la piel, significa que puede diagnosticarse precozmente y es curable, en un porcentaje que oscila entre el 85 y 99%.

La causa del cáncer de piel no es del todo conocida se han estudiado factores que influyen en su aparición. Los factores contribuyentes como los antecedentes familiares, el medio ambiente y las quemaduras producidas por la luz ultravioleta producen lesiones en la piel que pueden provocar cáncer. Actualmente parece claro que la radiación ultravioleta es el factor ambiental que más afecta la estructura funcionalidad de la piel. Una excesiva e inadecuada exposición a esta radiación puede conducir al envejecimiento prematuro de la piel y al desarrollo de cáncer. Es de suponer que las alteraciones provocadas en la piel por el exceso de la exposición a la radiación ultravioleta, repercuten en el comportamiento del sistema inmunológico. Las lámparas y cabinas bronceadoras fuente de radiación ultravioleta, predisponen al desarrollo de cáncer de piel cuando hay una exposición excesiva a ellas. La edad, los traumatismos o cicatrices y las infecciones virales también son factores predisponentes. Glucksman por su parte citó el desarrollo del cáncer de la piel no solo a partir de radiaciones sino también a partir de carcinógenos químicos.

El cáncer de piel a diferencia de otras neoplasias, se conoce en la mayoría de casos su causa: el exceso de exposición a radiación ultravioleta. Proveyéndole esto la ventaja de ser prevenible si se logran cambios en el estilo de vida.

### 1.5.4. Clasificación del cáncer de piel

---

2006;55(13):987-99.

<sup>77</sup> a) International Agency for Reserch on Cancer. Melanoma of skin ASR. Glob Cancer Obs [Internet]. 2019;1-2. Available from: [http://globocan.iarc.fr/old/bar\\_sex\\_site.asp?selection=16120&title=Melanoma+of+skin&statistic=2&populations=6&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=Execute](http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_site.asp?selection=16120&title=Melanoma+of+skin&statistic=2&populations=6&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=Execute).

Para fines prácticos el cáncer de piel se ha dividido en dos grandes grupos: cáncer de piel no melanoma y melanoma. Dentro del primer grupo encontramos principalmente al Carcinoma Basocelular y al Carcinoma Espinocelular.<sup>78, 76b</sup>

### A) Cáncer de piel Melanoma.

El melanoma cutáneo es una neoplasia que resulta de la transformación maligna de los melanocitos localizados fundamentalmente en la epidermis y en menor medida en la dermis o las mucosas. Así mismo puede desarrollarse a partir de melanocitos alterados denominados células nevicas, que son el constituyente fundamental de diversas lesiones precursoras del melanoma, tales como los nevimelanocíticos displásicos, congénitos y adquiridos. El melanoma se caracteriza por su gran agresividad, con una tendencia precoz a la diseminación linfática o hematógena, por lo que constituye el tumor cutáneo que origina una mayor mortalidad.<sup>79</sup>

### B) Cáncer de piel no melanoma.

#### a- Carcinoma Basocelular.

El Carcinoma Basocelular (CBC) es una neoplasia de malignidad limitada por su crecimiento lento y por su excepcional capacidad de dar metástasis. A los CBC no se les conoce lesión precursora y su origen es a partir de células madre indiferenciadas y pluripotentes de la capa basal epidérmica y folículos pilosebáceos<sup>78</sup>. Es el cáncer de piel más frecuente con cifras cercanas al 60% entre todos los cánceres, aparece generalmente después de la cuarta década de la vida, especialmente en cara, cuero cabelludo, orejas, cuello, pecho, espalda y con menos frecuencia en los miembros inferiores.<sup>79</sup>

#### b- Carcinoma Espinocelular.

El Carcinoma Espinocelular (CEC) es un tumor epitelial cutáneo-mucoso maligno procedente de los queratinocitos del estrato espinoso de la epidermis infiltrante y

---

<sup>78</sup>Ceballos EH, TUMORES MALIGNOS EPITELIALES Carcinomas Basocelulares y Carcinomas Espinocelulares. En: Rondón Lugo AJ. Temas Dermatológicos. Pautas diagnósticas y terapéuticas. Caracas: Tipografía Olímpica CA. 2001:262-9.

<sup>79</sup> Elliott LD, Rodríguez CR, Rodríguez SK, Méndez LC, Rodríguez DM. Caracterización clínica y epidemiológica de los pacientes con cáncer de piel no melanoma tratados con braquiterapia de alta tasa de dosis, entre enero del 2011 a diciembre 2014, en el Servicio de Radioterapia del Hospital México. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 2016 Jul 15;73(618):23-31.

destructor, que tiene capacidad de diseminación linfática y hemática, la mayoría aparecen sobre queratosis actínicas en áreas fotoexpuestas.<sup>78</sup>

### 1.5.5. Terapia del cáncer de piel

El objetivo del tratamiento será la escisión completa del tumor con una apariencia cosmética aceptable. Se tienen varias modalidades de tratamiento disponibles, su elección dependerá del tipo de lesión, su localización, las características del paciente y los recursos con los que se cuente. Podemos resumir el tratamiento en dos variantes: los procedimientos quirúrgicos y los no quirúrgicos. Dentro del primer grupo podemos enumerar las técnicas excisionales, es decir, la extirpación quirúrgica, y la cirugía micrográfica de Mohs.<sup>80</sup> En el grupo de los procedimientos no quirúrgicos tenemos el curetaje, la electrodesecación y la criocirugía, la radioterapia, el interferón intralesional, el 5-fluorouracilo (5-FU), la terapia fotodinámica, los retinoides, la quimioterapia y el imiquimod, entre otros<sup>80b</sup>

## 2. Fisiología alterada por el cáncer

### 2.1. Ciclo celular

Se denomina ciclo celular al conjunto de sucesos altamente regulado por el que una célula origina dos células hijas. Este ciclo incluye el periodo entre dos divisiones mitóticas, además de los procesos en los que la célula aumenta su tamaño, duplica su material genético y finalmente, se divide en dos células independientes. Para que la división celular tenga éxito tienen que darse dos condiciones esenciales: la replicación del ADN tiene que ser exacta y los cromosomas replicados tienen que distribuirse correctamente entre las dos células descendientes

Clásicamente, el ciclo celular se divide en cuatro fases:

1) La fase M o denominada mitosis que comprende la división nuclear o mitosis y la citoplasmática o citocinesis.

---

<sup>80</sup> a) Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med.* 2015;88(2):167–79. b) Lewin JM, Carucci JA. Advances in the management of basal cell carcinoma. *F1000Prime Rep.* 2015;7(May).

2) La fase G1 sigue a la citocinesis y se corresponde con el intervalo entre el final de la fase M y el inicio de la síntesis de DNA, en la cual, la célula aumenta de tamaño debido a la síntesis y desarrollo de estructuras como los microtúbulos, los microfilamentos de actina, los ribosomas, las proteínas, etc.

3) A continuación está la fase S (también llamada fase de síntesis) en la que la célula duplica su contenido de DNA.

4) El ciclo termina con la fase G2 o premitótica que abarca desde el final de la fase S hasta principio de una nueva mitosis. En esta fase se reparan algunos errores que ocurren en la duplicación del ADN.

Ante determinadas condiciones, en ausencia de estímulo mitogénico, las células pueden entrar en un periodo de latencia denominado fase G0 donde permanecen durante días, semanas o años dependiendo del organismo. Este estado de latencia se debe a la ausencia de factores de crecimiento.

Las moléculas reguladoras del ciclo celular están muy conservadas durante la evolución. Existen distintas proteínas, que ejercen el control en la entrada y la progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo celular<sup>48</sup>, como son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y ciclinas que pueden formar complejos CDK-ciclinas implicadas en la progresión de cada fase del ciclo. Hay que destacar los denominados puntos de control del ciclo, que se caracterizan por ser zonas donde puede ocurrir la detención del transcurso normal del ciclo (arresto), y que son capaces de detectar la presencia ADN dañado, para repararlo y evitar alteraciones genéticas. Se distinguen varios puntos de control, siendo los más importantes: el punto de transición G1/S, el punto de transición G2/M y el punto de control en la mitosis en la transición de metafase a anafase.

Cuando la célula no puede reparar un daño provocado en el ADN en los distintos puntos de control, se activa un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis que consiste en eliminar dicha célula e impedir que ese ADN dañado pase a las siguientes generaciones. Estos puntos de control son muy importantes, proporcionando una barrera contra el cáncer y representan una buena opción para la aplicación de agentes quimioterapéuticos.

Es por ello que para el desarrollo de un cáncer deben de fallar múltiples mecanismos que provocan que en la célula no se active la señalización de la apoptosis y evite la muerte incluso dividiéndose más rápidamente.

Cuando hay daño en el ADN y la célula no puede repararlo en los distintos puntos de control, se activa un mecanismo de muerte celular programada (apoptosis) para eliminar dicha célula y que no pase a las siguientes generaciones. Estos puntos de control son muy importantes proporcionando una barrera contra el cáncer y representan una buena opción para la aplicación de los agentes quimioterapéuticos.<sup>81</sup> Es por ello que para que se desarrolle un cáncer deben de fallar múltiples mecanismos que hagan que este tipo de células no active la señalización de la apoptosis y se divida más rápidamente evitando la muerte.

Existen diferentes genes implicados en el ciclo celular.<sup>82</sup> El más estudiado es el gen p53. Este gen ha sido llamado “guardián del genoma” por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Se trata de un gen supresor que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13, y codifica una proteína nuclear de 53 kDa. Este bloqueo p53 lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del ADN antes de que se replique. Este gen mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el ADN ha sido sustancial.<sup>83</sup>

La pérdida de la función normal del gen p53 puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas; de hecho son muy frecuentes las alteraciones en este gen en una variedad de cánceres humanos (más del 50 % de los tumores humanos están asociados a mutaciones en p53).<sup>49</sup> Se ha sugerido que la transformación maligna en ausencia de p53 reduce la reparación del ADN e incapacita la apoptosis de dicha célula.<sup>84</sup> Por otra parte, y regulado por p53, se encuentra el gen p21 en el cromosoma 6 (ubicación 6p21.2). Este gen codifica un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, el cual inhibe la actividad de las

---

<sup>81</sup> Klermund J, Bender K, Luke B. High nutrient levels and torc1 activity reduce cell viability following prolonged telomere dysfunction and cell cycle arrest. *Cell Rep.* 2014;9(1):324–35.

<sup>82</sup> Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol.* 2012;226(2):352–64.

<sup>83</sup> Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:375–404

<sup>84</sup> Oren, M.; Tal, P.; Rotter V. Targeting mutant p53 for cancer therapy. *Aging (Albany NY).* 2016;8(6):1159–60.



enzimas de los complejos ciclina-Cdk2 y ciclina-Cdk4. La proteína codificada por el gen p21 se llama CdkN1A (por sus siglas en inglés cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). CdkN1A regula el avance de la fase S del ciclo celular.<sup>85</sup>

## 2.2. Apoptosis

### 2.2.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis

La necrosis puede definirse como la muerte celular patológica, reconocible por los signos morfológicos de la necrofanerosis. Estos son: en el citoplasma, hipereosinofilia y pérdida de la estructura normal; en el núcleo, picnosis, cariólisis o cariorrexis (Fig.9). La picnosis es la retracción del núcleo con condensación de la cromatina; la cariólisis, la disolución del núcleo; la cariorrexis, la fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada. Las alteraciones del citoplasma y núcleo son coexistentes. La picnosis, cariólisis y cariorrexis no constituyen etapas de la alteración nuclear; representan, aparentemente, formas distintas de reacción. La muerte celular por necrosis es un proceso "pasivo" que no requiere de síntesis proteica, causado por la pérdida de la homeostasia. Se caracteriza por daño mitocondrial, rotura de la membrana, lisis celular y liberación de su contenido al medio extracelular.<sup>86</sup>

Por otra parte, la apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Determinados hechos celulares se pueden explicar por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumoral.<sup>87</sup>

Los mecanismos que regulan la muerte celular son esenciales para el normal desarrollo y mantenimiento de la homeostasia. Las células crecen controladamente gracias a la expresión de genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación

---

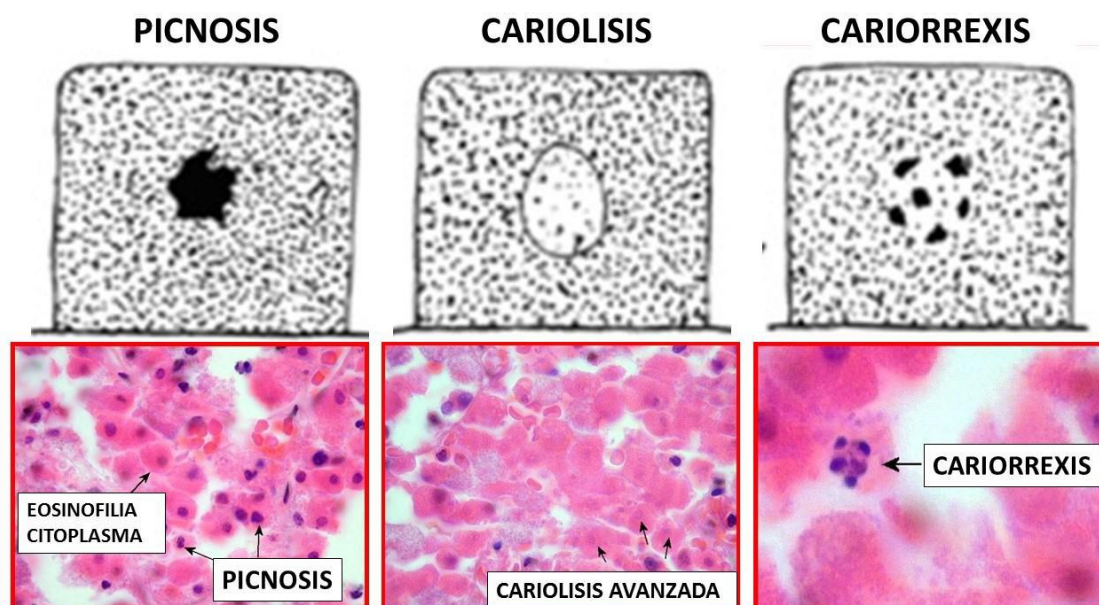
<sup>85</sup> Dutto I, Sukhanova M, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Scovassi AI, Lavrik O, Prosperi E. p21CDKN1A regulates the binding of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 to DNA repair intermediates. *PLoS One*. 2016;11(1):1–15.

<sup>86</sup> Conrad M, Angeli JPF, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(5):348–66.

<sup>87</sup> Lorda-Diez CI, Garcia-Riart B, Montero JA, Rodriguez-León J, Garcia-Porrero JA, Hurlé JM. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(11):974–85.

y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados.<sup>88</sup> Se considera la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte, que se desencadena por diversas señales, que pueden ser fisiológicas o estimulaciones exógenas. Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasia, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario<sup>87</sup>

Los trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores.<sup>89</sup>



**Figura 9.** Morfología nuclear en la necrosis.

En la Tabla 10, se resumen las diferencias entre la apoptosis y la necrosis. Las características de la célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren necrosis. En este último fenómeno el carácter patológico es la manifestación más grave de enfermedad a nivel celular. Se excluye de la necrosis toda muerte celular que no sea

<sup>88</sup> Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differ.* 2015;22(1):58–73.

<sup>89</sup> Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, Siegelin MD, Fimognari C, Kumar NB, Dou QP, Yang H. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:S78–103. Academic Press.

manifestación de enfermedad, por ejemplo, la apoptosis que ocurre en la muerte celular normal en los tejidos lábiles, en los que estos se encuentran normalmente sometidos a un recambio de células (eritrocitos, células epidérmicas, células de los epitelios respiratorio y digestivo, etc.). Se excluye también la muerte celular dentro del proceso de remodelación de órganos en desarrollo. No abarca tampoco la muerte celular que ocurre en el organismo muerto, como fenómeno cadavérico. No comprende, por último, la muerte de células separadas del organismo y producida por la acción de líquidos fijadores, pues dicha muerte no es manifestación de enfermedad.

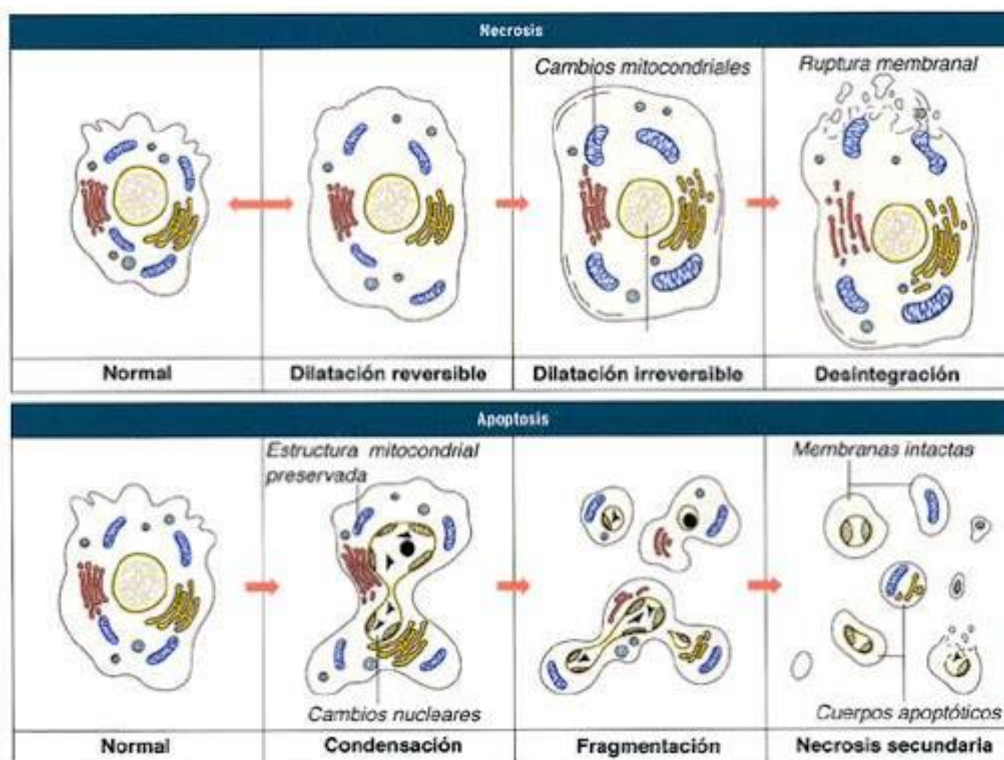
	<b>Necrosis</b>	<b>Apoptosis</b>
Condiciones	Patológica	– Fisiológica – Alteraciones patológicas
Tamaño celular	Edema	Retracción
Membrana citoplasmática	Lisis, rotura	Expresión de glucoproteínas
Mitocondria	Hinchazón, rotura	Funcional
Degradación del ADN	Aleatoria	Ordenada
Requerimiento energético	No	Sí
Reacción inflamatoria	Sí	No

**Tabla 10.** Diferencias entre los procesos de la apoptosis y la necrosis

### 2.2.2. Características morfológicas

La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana, aunque no llegue a fragmentarse. Durante el proceso final se produce la rotura internucleosomal del ADN y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria.<sup>90</sup> Fig.10a

<sup>90</sup> Onal M, Ovet G, Onal O. Review of Apoptosis. *MOJ Immunol.* 2016;3(1):1–4.



**Figura 10a.** Diferencias morfológicas entre la apoptosis y la necrosis.

### 2.2.3. Mecanismos de inducción de apoptosis

La apoptosis puede ser activada por estímulos y señales internas (intrínseca), y externas (extrínseca).

#### A) Caspasas

Antes de empezar a explicar el proceso, hay que explicar qué son las caspasas, que como se decía, son los elementos esenciales y que definen este tipo de muerte. Se denominan caspasas por el acrónimo en inglés (cysteine aspartyl-specific proteases)<sup>91</sup>. Las caspasas están en la célula en forma de zimógenos inactivos, procaspasas. Por lo tanto necesitan siempre una señal que las active.

Estos zimógenos están formados por tres dominios: un prodominio en el extremo aminoterminal y los dominios p20 (subunidad larga) y p10 (subunidad corta), que se encuentran en la enzima activa<sup>92</sup>. En todos los casos conocidos, las caspasas activas están compuestas por heterotetrámeros, que contienen dos heterodímeros p20/p10 y

<sup>91</sup> Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *British medical bulletin*. 1997 Jan 1;53(3):478-90.

<sup>92</sup> Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct;407(6805):770-6.

dos sitios activos de catálisis<sup>93</sup>. Sin embargo, es posible que pueda haber caspasas en forma de monómeros activos bajo determinadas condiciones. Una vez activas, las caspasas son capaces de cortar gran variedad de sustratos celulares. Dentro de la familia de las caspasas, las que tienen una función apoptótica se suelen dividir en caspasas iniciadoras y ejecutoras:

### Caspasas iniciadoras:

Las caspasas iniciadoras tienen un prodominio (DED) o card, que les permite unirse a moléculas adaptadoras y formar un complejo activador. Son capaces de auto-activarse e iniciar el proceso proteolítico, cortando y activando otras caspasas. La dimerización que induce la activación es necesaria, suficiente y reversible. Las caspasas iniciadoras 2, 8, 9, 10.

### Caspasas efectoras:

A diferencia de las iniciadoras, no son capaces de auto-activarse, necesitan ser cortadas y activadas por aquellas. Las caspasas efectoras cortan una gran cantidad de sustratos. Se conocen las caspasas 3, 6 y 7. No tienen un prodominio como las iniciadoras y están en forma de dímero inactivas. Al contrario que las iniciadoras, el corte de una subunidad de unión las activa, y este es un proceso imprescindible e irreversible.

Las propias características de las caspasas hacen a la inducción de apoptosis una intrincada red de activaciones e inhibiciones. Entonces, La iniciación y ejecución de la apoptosis, a nivel molecular, depende de la activación de las rutas extrínsecas y/o intrínsecas de muerte celular<sup>94</sup>. El proceso apoptótico está regulado por una gran cantidad de señales intracelulares. Hay dos importantes rutas de señalización en la inducción de apoptosis, la ruta dependiente de receptores de muerte celular y la ruta mitocondrial. Denominadas clásicamente como ruta extrínseca y ruta intrínseca de inducción de apoptosis<sup>95</sup>

---

<sup>93</sup> Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annual review of biochemistry. 1999 Jul;68(1):383-424.

<sup>94</sup>a) Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 1997 Aug 15;326(1):1-6. b) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *science*. 1998 Aug 28;1305-8. c) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

<sup>95</sup> a) Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001 Jan;2(1):63-7. b) Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.

### B) Vía extrínseca

También llamada de ligandos de muerte. En esta ruta participan los receptores de muerte y la caspasa iniciadora es la 8 (y la caspasa-10 en humanos). Esta ruta esta iniciada por ligandos extracelulares tales como TNF (tumor necrosis factor), FasL (Fas ligand) y Apo2L/TRAIL (Tumor necrosis factor-alpha- related apoptosis-Inducing ligand), cuyas señales se transmiten clásicamente por receptores de muerte celular, este tipo de receptores, pertenecen a las familias: CD95/Fas (FS7 (foreskin cell strain) associated sAg), TRAILRs/DR4 o DR5 (death receptor), TNFRs (tumor necrosis factor receptors) y NGFRs (nerve growth factor receptors) <sup>96</sup>.

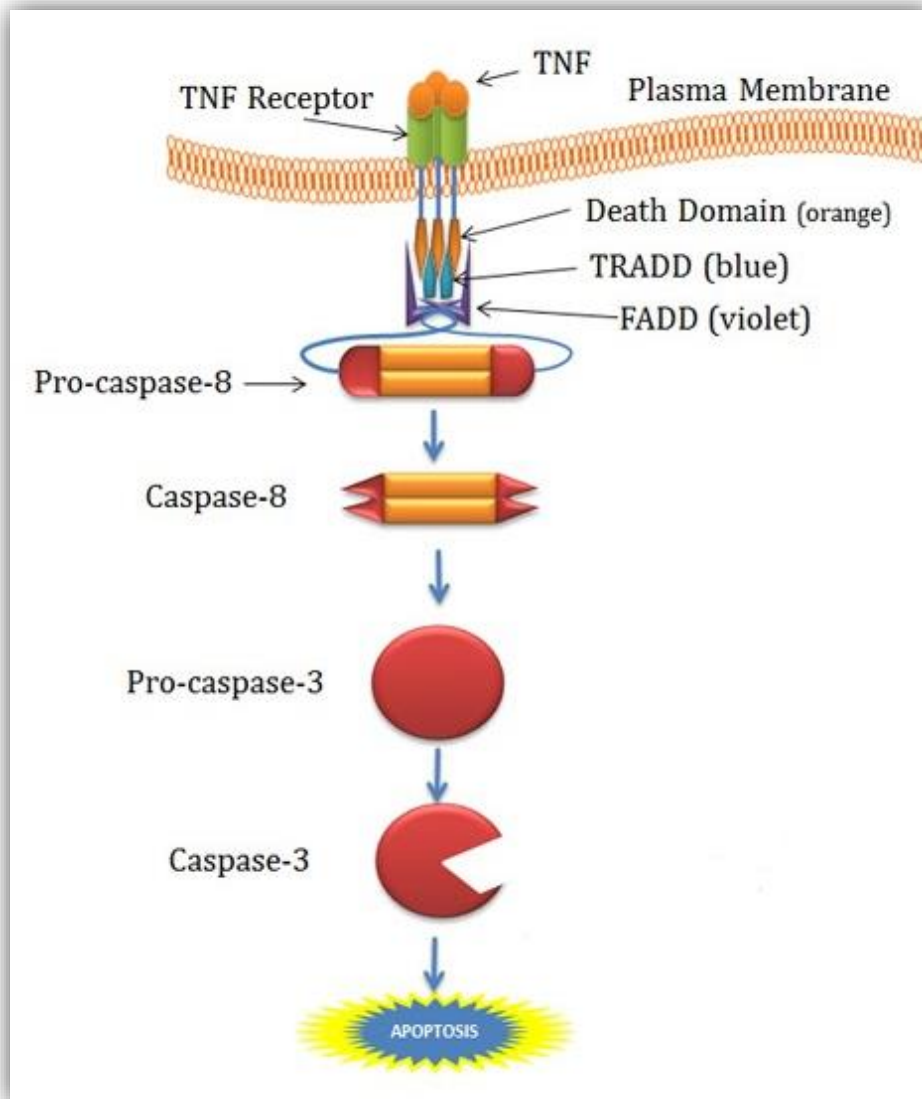
Cuando la señal es de muerte, al interaccionar el ligando con su receptor, se induce un rápido ensamblaje de un “complejo inductor de la señal” (DISC). El DISC contiene principalmente a la caspasa-8 (y 10 en humanos), estas a su vez activan por proteólisis a las caspasas efectoras, fundamentalmente a la caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7.

Existen varias rutas de activación de apoptosis mediada por receptores dependiendo de la familia a la que estos pertenezcan : Apoptosis mediada por el receptor CD95/Fas, apoptosis mediada por los receptores TNFRs (TNFR1/ TNFR2).

---

Nature reviews Molecular cell biology. 2001 Jan;2(1):67-71. c) Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer cell*. 2002 Feb 1;1(1):19-30.

<sup>96</sup> Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Jun;2(6):420-30.



**Figura 10b:** Ruta extrínseca de la apoptosis.

### C) Vía intrínseca

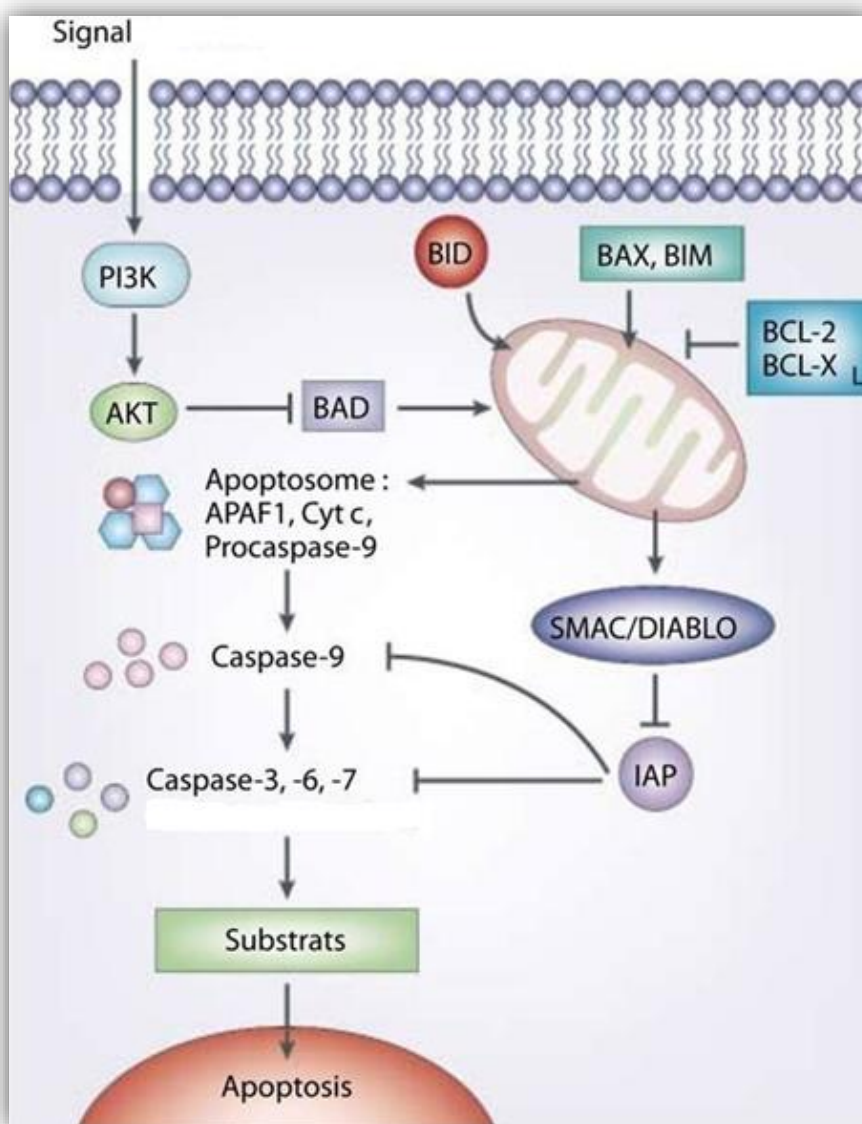
Otra ruta bien conservada para inducir apoptosis es la ruta mitocondrial o intrínseca. Como su nombre indica, el eje central de control de esta vía es la mitocondria. Las proteínas fundamentales en la vía intrínseca son las proteínas de la familia Bcl-2. Dentro de esa familia hay proteínas anti o proapoptóticas.<sup>97</sup>

Cuando el estímulo supera un umbral determinado, las proteínas Bax y Bak se

<sup>97</sup> Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death & Differentiation*. 2002 May;9(5):505-12.  
 b) Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.

activan y polimerizan en la membrana mitocondrial externa. Este proceso está inhibido por las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl- 2, Bcl-xL o Mcl-1).

La polimerización de Bax y Bak induce la formación de un poro por el que saldrán proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria, entre las que está el citocromo C. Cuando el citocromo C difunde, se une a una proteína llamada APAF1, que a su vez recluta a la caspasa iniciadora de la vía intrínseca, la caspasa-9. Cuando esta se activa, corta sus substratos, entre los que están otras caspasas ejecutoras como caspasa-3 y 7. Desde este momento el proceso es irreversible<sup>98</sup>



**Figura 10c:** Ruta intrínseca de la apoptosis.

<sup>98</sup> Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):929-38. b) Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell*. 1998 Jun 1;1(7):949-57.



### 3. Generalidades sobre la respuesta inmunitaria

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo y surge como una respuesta del sistema inmune ante un estímulo perjudicial; iniciada por factores externos o internos, como lesiones por agentes físicos, químicos o inmunológicos y termina con la destrucción permanente del tejido o con su curación. Durante la respuesta inflamatoria, se desata una compleja cascada de eventos celulares: activación de enzimas, liberación de mediadores químicos, extravasación de fluidos, migración celular, ruptura y reparación tisular <sup>99</sup>

Los agentes desencadenantes de la respuesta inflamatoria son de naturaleza muy variada, pudiendo ser estímulos físicos, químicos, agresiones por seres vivos o agresiones inmunológicas. La respuesta inflamatoria da lugar a una sintomatología local, caracterizada por dolor, rubor, tumor y calor, acompañada de la incapacidad funcional del tejido afectado y a una reacción sistémica que conlleva al desarrollo de fiebre, leucocitosis y aumento en la concentración plasmática de determinadas proteínas. La reacción inflamatoria tiene como finalidad la defensa del organismo frente al agente causal y la restauración del tejido lesionado. Dependiendo del órgano afectado y del balance entre el agente inductor y la respuesta inflamatoria, el proceso inflamatorio puede dar lugar a la restauración completa del tejido lesionado, a su sustitución por un tejido cicatricial o al fracaso de la respuesta inflamatoria y la subsiguiente cronificación del proceso. Las consecuencias de dicho fracaso dependerán del órgano afectado <sup>100</sup>

En los últimos años, las enfermedades crónico-degenerativas como artritis reumatoide y diabetes que involucran diversos procesos inflamatorios, han desplazado a las enfermedades infecciosas como principales causas de mortandad.<sup>101</sup> La alta incidencia de enfermedades crónicas en las que está involucrada la inflamación y la presencia de efectos adversos en muchos de los fármacos utilizados comúnmente, ha orientado las investigaciones hacia la búsqueda de nuevos principios activos, con el objetivo de encontrar estructuras que brinden mayor eficacia y seguridad para controlar los efectos nocivos de la inflamación.

---

<sup>99</sup> Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. 1995;44(1):1–10.

<sup>100</sup> Cirilo, Antonio Delgado, Cristina Minguillón Llombart, and Jesús Joglar Tamargo. Introducción a la química terapéutica. Ediciones Díaz de Santos, 2003. 13–27 p

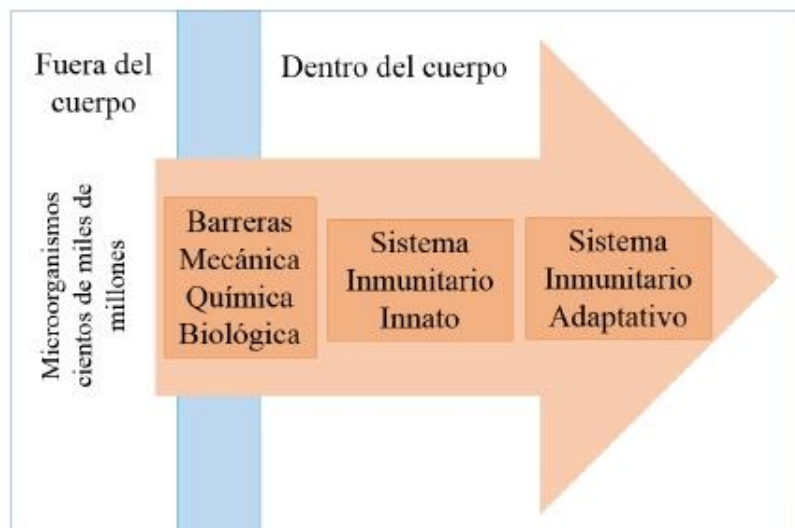
<sup>101</sup> Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Patología estructural y funcional. 1995. (No. 407 COT).

### 3.1. Sistema inmune

El sistema inmune tiene como función principal la integridad biológica del individuo (homeostasis), y presenta tres líneas de defensa. Fig.11

La primera está formada por una serie de barreras mecánicas como la piel; químicas como el medio ácido del estómago y biológicas como los microorganismos simbioses que protegen el organismo.

Si estas barreras sufren una pérdida de continuidad, se activa la segunda barrera protectora que es el sistema inmune innato y posteriormente puede actuar la tercera línea de defensa que es el sistema inmune adaptativo <sup>102</sup>



**Figura 11.** Imagen adaptada de Doan, (2008). Protección y respuesta frente a la invasión microbiana.

#### 3.1.1. Inmunidad innata y adaptativa

##### D) Inmunidad Innata:

también llamada natural o nativa, consta de mecanismos celulares y bioquímicos que existen incluso antes de la infección y que pueden responder con rapidez a ella. Estos

<sup>102</sup> Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. Lippincott's illustrated reviews: inmunología. Barcelona: Wolters Kluwer Health España/Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 25–37 p.

mecanismos pueden reaccionar con elementos generados por los microorganismos. Los principales componentes son:

- ◆ Barreras físicas y químicas: Epitelio y sustancias químicas antimicrobianas producidas en la superficie del epitelio.
- ◆ Células fagocíticas: neutrófilos y macrófagos y otras células linfocíticas innatas
- ◆ Proteínas sanguíneas y otros mediadores de la inflamación.

El sistema inmunitario innato obstaculiza la entrada de microorganismos y elimina o limita el crecimiento de muchos de ellos capaces de colonizar tejidos. Los principales puntos de interacción entre el individuo y el medio externo son: la piel, pulmones, aparato digestivo y respiratorio, que se encuentra recubierto por epitelios continuos, que actúan como barreras para impedir la entrada de microorganismos procedentes del medio externo. Si logran atravesar esta barrera, se encuentran con las células de la inmunidad innata. La principal reacción del sistema celular innato es la inflamación <sup>103</sup>

### E) Inmunidad adaptativa:

Este sistema puede reconocer un gran número de sustancias microbianas y otros tipos de moléculas, reaccionando frente a ellas. Ésta característica que permite distinguir diferentes sustancias, se denomina especificidad. Al mismo tiempo tiene la capacidad de responder de forma más intensa a exposiciones repetidas del mismo organismo, que se conoce como memoria. Los únicos elementos de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B. Los linfocitos son capaces de reconocer sustancias externas ajenas al organismo denominado antígeno, produciendo anticuerpos para defenderse de éstas sustancias <sup>97</sup>

### 3.1.2. Células del sistema inmune

Los glóbulos blancos o leucocitos desempeñan la función de centinelas y defensores contra las infecciones mediante la vigilancia del medio interno. Se mueven por el organismo a través del sistema circulatorio (linfáticos y sanguíneo), y pueden salir y

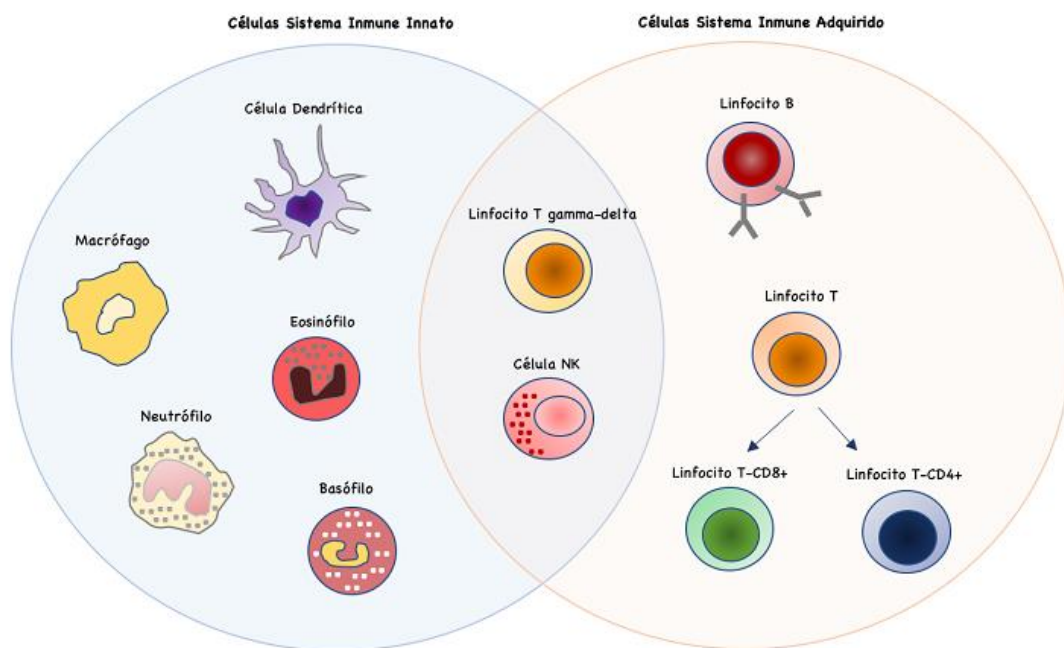
---

<sup>103</sup> Abbas, A. K., Lichtman, A.H., Pillai S. Células y tejidos del sistema inmunitario, Inmunología celular y molecular. Abbas 7ma. Inc. E, editor. Hepatology International. Barcelona. España; 2015. 13–22; 51–59 p.

volver a entrar en éste sistema, para moverse a través de los tejidos corporales. Los leucocitos desempeñan diferentes en la defensa del organismo. Su clasificación se realiza según su linaje hematopoyético y morfología (número de lóbulos del núcleo y granulación citoplasmática). Fig. 12.

♦ **Leucocitos no granulares:** tienen un solo núcleo no lobulado y un citoplasma que contienen pocos o ningún gránulo: Linfocitos B, Linfocitos T, linfocito NK, Monocitos y Macrófagos, Células dendríticas

♦ **Leucocitos Granulares:** estas células tienen núcleos multilobulados y gránulos citoplasmáticos que contienen aminas (que se tiñen con colorantes básicos), proteínas básicas (que se tiñen con colorantes acidófilos o eosinófilos) o ambos, tinción neutra: Eosinófilo Basófilos o mastocitos Neutrófilos.



**Figura 12.** Células del sistema inmune (Innato y adaptativo)

♦ **Leucocitos Granulares:** estas células tienen núcleos multilobulados y gránulos citoplasmáticos que contienen aminas (que se tiñen con colorantes básicos), proteínas básicas (que se tiñen con colorantes acidófilos o eosinófilos) o ambos, tinción neutra: Eosinófilo Basófilos o mastocitos Neutrófilos.

Los macrófagos forman parte del sistema fagocítico mononuclear, el cual engloba a un conjunto de células (monoblastos, promonocitos, monocitos y macrófagos) derivadas de un precursor común y una de cuyas funciones principales es la fagocitosis. Junto con los neutrófilos, el sistema fagocítico mononuclear constituye el principal mecanismo de defensa del organismo frente a agentes extraños como los microorganismos<sup>97</sup>, a diferencia de otras células del sistema inmunológico, tales como los linfocitos B y T, los cuales en condiciones basales se encuentran en quiescencia o reposo y cuya activación siempre conlleva un proceso de expansión clonal caracterizado por una elevada tasa proliferativa, los macrófagos, o bien se encuentran proliferando, o bien se activan, dejan de proliferar y pasan a ejercer sus funciones específicas. En ausencia de estímulos que los induzca a proliferar o a activarse, los macrófagos sólo pueden permanecer en estado de reposo durante un corto periodo de tiempo y posteriormente mueren por procesos de apoptosis

104

### 3.1.3. Mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata

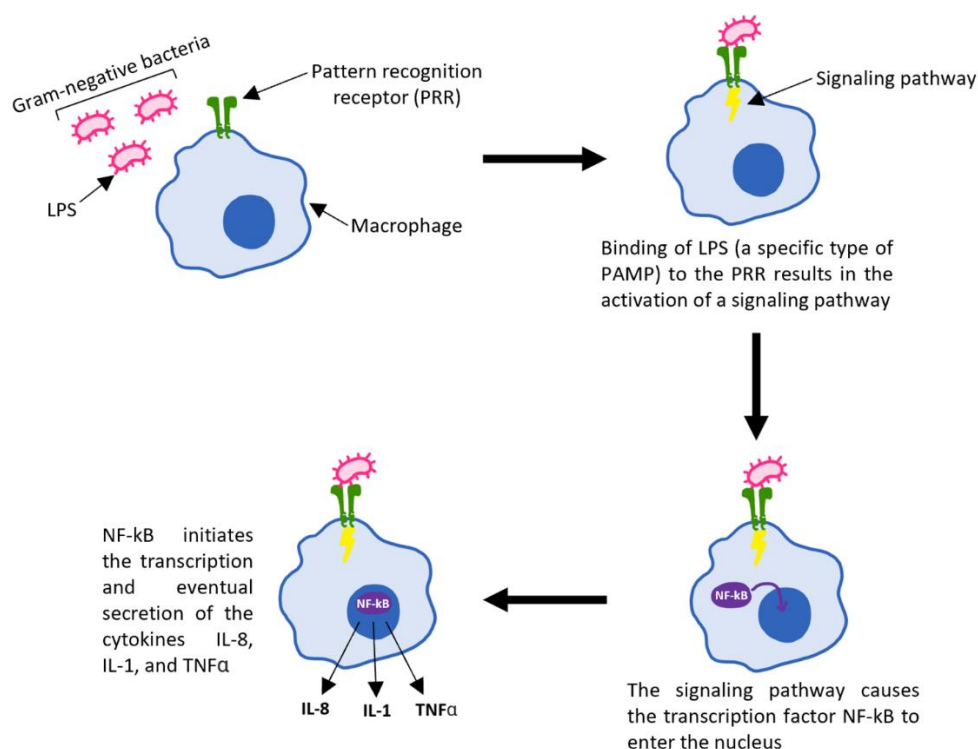
Las células de la inmunidad innata emplean diferentes mecanismos de reconocimiento, los cuales median el reconocimiento de estructuras moleculares presentes en grupos de microorganismos. Estas estructuras moleculares se denominan patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP) del inglés pathogen-associated molecular pattern y a los receptores que los reconocen se los denomina receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del inglés pattern recognition receptor. Fig.13

Las células de la inmunidad innata emplean diversos PRR, que pueden expresarse en la superficie celular o intracelular de la célula de inmunidad innata. Sin embargo, los PRR de nuestro interés son los receptores tipo toll (TLR). Los TLR constituyen una familia de proteínas que reconocen y se unen a los PAMP propios de los microorganismos. De los TLR identificados hasta el momento se conoce que el TLR4 tiene la capacidad de reconocer lipopolisacáridos (LPS), componente de la membrana externa de bacterias gramnegativas, responsables de la inducción de cuadros inflamatorios. También se conoce que el TLR2 reconoce peptidoglucanos de bacterias grampositivas y lipopéptidos presentes en numerosas bacterias.

---

<sup>104</sup> Celada A. Inmunología Básica. Labor B, editor. Barcelona, Spain; 1994.

El reconocimiento de los PAMP por los TLR expresados en las células de inmunidad innata conducen a la activación de vías de señalización, que dan lugar a la producción de un amplio conjunto de mediadores inflamatorios, como: especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), quimiocinas y citoquinas <sup>96, 105</sup>



**Figura 13.-** La unión PRR-PAMP activa los fagocitos. El reconocimiento y la unión de los PAMP existentes en la superficie de los microbios por parte de los PRR en la superficie de los fagocitos, activa éstos para que ingieran y degraden los microbios, figura adaptada de Doan, (2013). <sup>96</sup>

### 3.1.4. Fases de la reacción inflamatoria

Para poder sistematizar los acontecimientos que tienen lugar durante la inflamación, se puede dividir la respuesta inflamatoria en varias fases: fase inicial, fase vascular, fase celular y fase de reconstrucción de los tejidos afectados.

<sup>105</sup> Trevani AS, Geffner JR, Faimboin L. Inmunidad innata: neutrófilos, macrófagos y células natural killer. En L. Faimboin. (Ed), Introducción a la Inmunología Humana. Medica E, editor. Buenos Aires. Argentina; 2005. 60–69 p.

a) - **Fase inicial:** al interactuar el estímulo dañino con los tejidos se induce la liberación de gran cantidad de mediadores, unos ya preformados en los tejidos como la histamina, y otros que se sintetizan y se liberan como resultado de esta interacción como es el caso de los derivados del ácido araquidónico (AA) (prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs)), factor agregante plaquetario (PAF) y radicales libres de oxígeno. Al actuar los mediadores citados sobre los vasos sanguíneos se inicia la fase vascular.

b) - **Fase vascular:** Esta fase consiste fundamentalmente en una vasodilatación, subsiguiente aumento de la circulación seguido de enlentecimiento y estasis de la sangre, aumento de la permeabilidad capilar y exudación del líquido vascular. El líquido exudado contiene gran cantidad de mediadores de la inflamación que actúan sobre las células vecinas y sobre los vasos. Se inician en este momento tres cascadas enzimáticas: el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación. Cuando se produce el estasis vascular y consiguiente extravasación pasan a los tejidos vecinos células hemáticas que junto a los mastocitos ya existentes en los tejidos inician la fase celular. Toda reacción inflamatoria desemboca en una necrosis tisular más o menos importante.

c) - **Fase de reconstrucción de los tejidos afectados:** La reconstrucción de los tejidos depende de la cantidad de pérdida de tejido durante el proceso inflamatorio, de la capacidad de proliferación del tejido afectado y de la persistencia o repetición del agente lesivo. Puede ocurrir que la inflamación desaparezca sin dejar rastro (curación) o si los tejidos han sido lesionados (citotoxicidad, supuración...), queda un tejido cicatrizal que puede tener graves consecuencias patológicas para la función en determinados órganos como el ojo.

### 3.1.5. Proceso molecular involucrado en la respuesta inflamatoria :

#### Mediadores de la inflamación

La inflamación debe verse como la verdadera orquestación de la dinámica de la respuesta inmune. Entre las moléculas que favorecen su desarrollo se encuentran sustancias vasoactivas, citocinas, quimiocinas, metabolitos lipídicos, inmunoglobulinas, moléculas de adhesión celular (MACs), selectinas, integrinas y sus ligandos, así como los sistemas

de las cininas, coagulación, complemento y el fibrinolítico. Existen variadas moléculas de las antes mencionadas que pueden desempeñar una función antiinflamatoria.<sup>106</sup> Actualmente se emplea la detección y estudios de mediadores proinflamatorios para comprender la etiopatogenia de algunas enfermedades. Por ejemplo, la microglia produce sustancias que son claves en los procesos neurodegenerativos del Alzheimer y el Parkinson.

Los mediadores son sustancias presentes en el medio extracelular que permiten la comunicación entre las diferentes células que participan en las reacciones inflamatorias o inmunológicas. Académicamente podemos distinguir dos tipos de mediadores: humorales y celulares.

Las células que intervienen en la inflamación pueden ser de la inmunidad innata como los neutrófilos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas a nivel del epitelio. Las células epiteliales son las primeras que detectan el daño por sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los linfocitos T y B son los efectores de la inmunidad adquirida.<sup>95</sup>

Por un lado la estimulación de la célula desencadena la síntesis de mediadores humorales a partir de precursores inactivos presentes en los humores (plasma). Por otro lado, los mediadores celulares son preformados en las células y la activación de las mismas produce su liberación. Los mediadores son múltiples según su naturaleza química (aminas, péptidos, proteínas, lípidos) y su actividad biológica. Tienen como característica común una vida biológica muy corta, ya que sólo son activos durante el período de inflamación porque son rápidamente inactivados por el catabolismo o por la acción de antagonistas. Los mediadores celulares y los factores que activan los mediadores humorales proceden de las diferentes células que participan en las reacciones inflamatorias e inmunológicas.

### Principales efectores moleculares

El sistema del complemento se puede activar por tres vías: clásica, alternativa y de las lectinas. Integrado por más de 60 proteínas zimógenas, plasmáticas y de membrana.

---

<sup>106</sup> Pérez Martín OG, Vega García IG. La Inmunología en el humano sano para estudiantes de Ciencias Médicas. Editorial Ciencias Médicas. La Habana. Cuba. 2016.



Durante la cascada enzimática se liberan mediadores proinflamatorios con efectos locales y sistémicos.

Las citoquinas, quimiocinas y sus receptores, así como también algunas proteínas citoplasmáticas como la serina/treonina k (IKK, enzima que fosforila I B y consecuentemente activa NF- B), el sistema enzimático fosfatidil-inositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt, que a su vez activa IKK) y el complejo I B/NF-B, están involucrados en la fisiopatología de muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo: sepsis, AR, arteriosclerosis, EPOC (en inglés se llama COPD, chronic obstructive pulmonary disease) y asma; es por ello, que estas moléculas constituyen un excelente blanco para la búsqueda de fármacos anti-inflamatorios <sup>107</sup>

Las citocinas proinflamatorias como las Interleucinas (IL) IL-1, 6 y 8, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) son detectadas en plasma en las primeras 24 horas. La activación de los macrófagos, que sintetizan el TNF- $\alpha$  en pulmón, riñones e hígado, estimula la producción por los linfocitos, los macrófagos y las células endoteliales de las siguientes citocinas: interferón (INF), factor estimulante de las colonias de neutrófilos (FECN) y factor activador plaquetario (PAF). El INF y la IL1 estimulan la síntesis y liberación del óxido nítrico, inducen la quimiotaxis y activación de neutrófilos en órganos diana. La IL-6 es producida principalmente por la activación de microglías y astrocitos en diferentes regiones del cerebro. <sup>108</sup>

La Interleucina-32 (IL-32), es una citocina proinflamatoria, sintetizada por las NK (natural killer), monocitos, células epiteliales y linfocitos T. Estimula la producción de la proteína-2 inflamatoria de macrófagos (MIP-2), así como de varias quimiocinas y citocinas inflamatorias como son IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF-  $\alpha$ . Además, se ha descrito que la IL-32 cumple una función en la patogenia de la artritis reumatoide, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la enfermedad inflamatoria intestinal. IL-32 $\beta$

---

<sup>107</sup> Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct;25(51):6680-4.

<sup>108</sup> Chen J, Wu Y, Yu J, Shen J. Association between tumor necrosis factor alpha rs1800629 polymorphism and risk of osteoarthritis in a Chinese population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2018;51(8).

(uno de los subtipos) está implicada en el aumento de la adhesión de células del SI a células endoteliales activadas.<sup>109</sup>

Las leptinas son citocinas producidas predominantemente por los adipocitos, con un papel importante en la inflamación. Tienen un papel mayor en la fase proinflamatoria crónica como la vista en la obesidad, el síndrome metabólico y complicaciones como la aterosclerosis. Estímulos inflamatorios como lo son IL-1, lipopolisacáridos (LPS) y TNF- $\alpha$  pueden aumentar los niveles de las leptinas y de manera bidireccional, estas regulan la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-6, citocinas proinflamatorias que aumentan aún más el proceso inflamatorio.<sup>(13)</sup> La proteína C reactiva es un reactante de fase aguda, pues sus niveles aumentan en respuestas inflamatorias. Es capaz de activar y regular el complemento por la vía clásica. Se sintetiza en el hígado y los adipocitos. En el suero posee dos conformaciones: monomérica o pentamérica.<sup>110</sup>

Entre las moléculas antiinflamatorias se encuentra el TGF- $\beta$  con efectos pro y antiinflamatorios, que se sintetiza por células mononucleares y macrófagos. La IL-6 según el receptor al que se una puede tener efectos que favorecen o disminuyen la inflamación. La IL-10 producida por macrófagos permite el control de los procesos inflamatorios cuando son dañinos. Las interleucinas IL-4, 5, 9 y 13 intervienen en la estimulación de la respuesta inmune innata y adaptativa ante helmintos, alergias y reparación tisular. Son sintetizadas por las células linfocíticas innatas y los linfocitos T diferenciados a Th2.<sup>111</sup>

En la tabla 11 se recogen los principales mediadores de inflamación y sus papeles en la respuesta antiinflamatoria:

---

<sup>109</sup> Khawar B, Abbasi MH, Sheikh N. A panoramic spectrum of complex interplay between the immune system and IL-32 during pathogenesis of various systemic infections and inflammation. *European journal of medical research*. 2015 Dec;20(1):1-8.

<sup>110</sup> a) Chirco KR, Potempa LA. C-reactive protein as a mediator of complement activation and inflammatory signaling in age-related macular degeneration. *Frontiers in immunology*. 2018 Mar 15;9:539. b) Iglesias-González IM, Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Junco-Calzadilla R, Ramírez Agüera PJ, Torres López D, Janero Valdés A. Reactantes de fase aguda en reumatología. *Revista Cubana de Reumatología*. 2014 Apr;16(1):59-62.

<sup>111</sup> Klose CS, Mahlaköiv T, Moeller JB, Rankin LC, Flamar AL, Kabata H, Monticelli LA, Moriyama S, Putzel GG, Rakhilin N, Shen X. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature*. 2017 Sep;549(7671):282-6.

Papel de la Inflamación	Mediadores
Vasodilatación	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prostaglandinas</li> <li>- Óxido nítrico</li> <li>- Histamina</li> </ul>
Aumento de la permeabilidad vascular	<ul style="list-style-type: none"> <li>Histamina y Serotonina</li> <li>- C3a y C5a (mediado por vasoaminas)</li> <li>- Bradiquinina</li> <li>- Leucotrienos C4, D4, E4</li> <li>- Factor activador de las plaquetas (PAF)</li> <li>- Sustancia P</li> </ul>
Quimiotaxis, reclutamiento de leucocitos y activación	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF, IL-1</li> <li>- Quimioquinas</li> <li>- C3a, C5a</li> <li>- Leucotrieno B4</li> <li>- Productos bacterianos, como péptidos Nformilmetil</li> </ul>
Fiebre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF, IL-1</li> <li>- Prostaglandinas</li> </ul>
Dolor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prostaglandinas</li> <li>- Bradiquinina</li> <li>- Sustancia P</li> </ul>

Daño tisular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzimas lisosomales de los leucocitos</li> <li>- Especies reactivas del oxígeno</li> <li>- Óxido nítrico</li> </ul>
--------------	--

**Tabla 11.** Papel de los mediadores en las diferentes reacciones de la inflamación

### Óxido nítrico

El óxido nítrico producido por los macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar los grupos sulfhidrilos de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno, el cual resulta ser fuertemente oxidante, y un radical hidroxilo, muy reactivo. La producción incontrolada de óxido nítrico por parte del macrófago en caso de shock séptico puede producir vasodilatación periférica extrema con la consiguiente hipotensión que conlleva al shock y a su vez el óxido nítrico también ha sido involucrado en diversas enfermedades inflamatorias <sup>112</sup>

El NO es un gas radical libre de fácil difusión, con vida media de 10 a 20 segundos, producido de forma endógena por una gran variedad de células. Es sintetizado en cantidades equimoleculares por una familia de óxido-reductasas conocidas como NOS, a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno. Se conocen tres isoenzimas de la NOS, una de ellas es inducible (iNOS), también denominada de tipo II (NOS II); es una enzima no dependiente de calcio, la cual puede ser inducida en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y en células de la musculatura lisa y del endotelio vascular, como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como el interferón gamma, el TNF- y el LPS bacteriano y ser inhibida por GCs. La isoforma iNOS cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos

<sup>112</sup> a) Pérez Ruiz, A., Rodríguez Calzadilla, A., Sanjurjo Gómez, V., Padrón Chacón R. El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Rev Cuba Estomatol.* 1997;34(2):84-86. b) Gómez Estrada HA, González Ruiz KN, Medina JD. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat.* 2011;10(3):182-217.

celulares. El NO puede funcionar como una molécula pro-inflamatoria, mediante la activación de las enzimas COX y con ello aumentar la producción de las PGs <sup>113</sup>

Existen otras isoformas de la enzima NOS, la de tipo constitutiva endotelial (eNOS, también conocida como NOS III) y la constitutiva/variable neuronal (nNOS o NOS I).

Estas enzimas producen

NO en pequeñas cantidades y son las responsables de los niveles normales de este gas en el organismo, entre cuyas funciones resaltamos su participación en diversos procesos de neurotransmisión, la transducción de señales y la relajación del músculo liso vascular y su participación como una sustancia anti-inflamatoria a través de varios mecanismos, por ejemplo, el NO puede inhibir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, lo que impide su entrada al tejido lesionado. <sup>114</sup>

### 3.1.6. Macrófagos

Una vez en los tejidos requeridos, los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunológica. En el contexto de la inmunidad natural, los macrófagos fagocitan y eliminan partículas extrañas, tales como bacterias, virus, parásitos, macromoléculas, e incluso células propias dañadas o muertas, como es el caso de los eritrocitos viejos y de las células apoptóticas, impidiendo así que estas puedan verter su contenido potencialmente tóxico al medio extracelular y evitando, por tanto, el posible desencadenamiento de procesos inflamatorios.

Además, los macrófagos pueden matar células tumorales mediante la secreción de ciertas enzimas (por ejemplo, perforina y granzima), citocinas (TNF- $\alpha$ ) e intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno (Tabla I), así como a través de fenómenos de interacción célula-célula. El mecanismo de citotoxicidad de estos efectores consiste en la inducción de apoptosis de las células diana <sup>115</sup>. Una vez estas células se convierten en cuerpos apoptóticos, el macrófago puede fagocitarlos y degradarlos eficazmente. Del mismo modo, los macrófagos pueden provocar la muerte extracelular de

---

<sup>113</sup> Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$  B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct;25(51):6680-4.

<sup>114</sup> Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999 Feb 1;276(2):G315-21.

<sup>115</sup> Aliprantis AO, Diez-Roux G, Mulder LCF, Zychlinsky A, Lang RA. Do macrophages kill through apoptosis? *Immunol Today*. 1996;17(12):573-6.

microorganismos y controlar la dispersión de una infección mediante la secreción de enzimas (por ejemplo, lisozima), metabolitos del oxígeno y del nitrógeno e intermediarios del metabolismo lipídico (por ejemplo, prostaglandinas)

### Activación de los macrófagos

La activación de los macrófagos es un proceso complejo y estrictamente controlado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que culminan en el aumento del potencial de la célula para ejercer funciones complejas, tales como la presentación de antígenos, la lisis de células tumorales y la actividad bactericida. Los agentes más potentes en la activación de los macrófagos son la citocina IFN- $\gamma$  y el lipopolisacárido (LPS), aunque también otros agentes como el GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-4 y TNF- $\alpha$  pueden inducir algunos aspectos de la activación <sup>98, 116</sup>

### El Lipopolisacárido (LPS)

El LPS, también conocido como endotoxina, es uno de los componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas. Desde el punto de vista estructural, el LPS está formado por tres regiones distintas: una región central compuesta por polisacáridos repetitivos, una estructura de tipo antígeno-O, ambas hidrofílicas, y un dominio hidrofóbico formado por seis cadenas de ácidos grasos, también denominado lípido A, que representa el componente biológicamente activo del LPS. Debido a su estructura, el LPS actúa como una molécula anfipática y muy poco soluble en soluciones acuosas <sup>117</sup>. El LPS funciona como un antígeno timo-independiente, es decir, es capaz de estimular a los linfocitos B en ausencia de linfocitos T cooperadores. Además, el LPS activa a los linfocitos B sin la necesidad de interactuar con las inmunoglobulinas presentes en la superficie de este tipo celular <sup>98</sup>

En los macrófagos, el LPS induce la síntesis de citocinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\alpha/\beta$ , TGF- $\beta$ , metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y otros lípidos bioactivos (factor activador de plaquetas, etc), péptidos quimiotácticos como MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein), y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

---

<sup>116</sup> Hamilton, T.A., y Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in *macrophages*. *Immunol Today*. 1987;8(5):151-158.

<sup>117</sup> Ulevitch, R.J., y Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:437-57.

### 3.1.7. Tipos de Inflamación y enfermedades crónicas

El proceso inflamatorio puede clasificarse como agudo o crónico, según la naturaleza y la eficacia de la respuesta inicial. La inflamación aguda se define como transitoria y de respuesta inicial a una lesión. Es decir, es de inicio rápido y de corta duración, que dura unas horas o algunos días. Se caracteriza por la liberación de numerosos mediadores químicos, y conduce a la exudación de proteínas y de plasma (edema) y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. La inflamación aguda puede tener diferentes causas tales como: infecciones (bacterianas, virales, fúngicas, parasitarias, toxinas microbianas, necrosis tisular de diversas causas, isquemia, traumas, lesiones físicas y químicas). La importancia de este proceso inflamatorio se relaciona con la dificultad en la eliminación de los estímulos que lo activan. La persistencia de la inflamación aguda puede provocar un proceso inflamatorio crónico <sup>118</sup>

Una inflamación exacerbada se considera un factor crítico en muchas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, la obesidad, la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento<sup>119</sup>. El estrés persistente del ambiente inflamatorio y oxidativo, causa daño a los tejidos epiteliales vecinos, lo que conduce a cambios en el funcionamiento fisiológico de los mismos. El mantenimiento de estos cambios durante un largo período de tiempo pueden conducir a la patogénesis de diversos trastornos autoinmunes, alterando innumerables vías de señalización <sup>120</sup>

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno conducen a la progresión de la respuesta inflamatoria en un ciclo sin fin. Por éste motivo, el estudio de moléculas procedentes de fuentes naturales, capaces de detener este ciclo, es de gran valor para frenar el proceso inflamatorio, evitando de ésta manera la utilización de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) que pueden causar numerosos efectos secundarios indeseados <sup>104</sup>

---

<sup>118</sup> Ribeiro. Daniela., Freitas, Marisa., L. F. C. Lima, José. and EF. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Med Res Rev.* 2015;5:877–936.

<sup>119</sup> Santangelo C, Varì R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):394–405.

<sup>120</sup> a) Joseph S V., Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(3):419–44. b) Srivastava S, Singh D, Patel S, Singh MR. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. *Int J Biol Macromol.* 2017;101:502–17.

### 3.1.8. Terapia antiinflamatoria

Los medicamentos antiinflamatorios ayudan a controlar las complicaciones del proceso de inflamación y las enfermedades que se derivan de ellas. Podemos encontrar dos grupos de agentes antiinflamatorios: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los antiinflamatorios esteroideos. Los AINES, constituyen un grupo muy heterogéneo que tienen como mecanismo de acción, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que son liberadas cuando hay daño tisular, presentes en exudados inflamatorios, promueven la sensibilización de los noniceptores, así como la mediación de procesos de inflamación, fiebre e interferencia en los mecanismos de agregación plaquetaria <sup>121</sup>

Los agentes antiinflamatorios esteroideos inhiben la producción de moléculas proinflamatorias, derivadas del ácido araquidónico vía la inhibición de la fosfolipasa A2, inhiben la activación de moléculas de adhesión ICAM-1. ELAM-1, diversas citosinas, TNF $\alpha$ ,  $\Upsilon$ -interferón, entre otros <sup>107</sup>

---

<sup>121</sup> Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13(3):115–26.



# OBJETIVOS

## 1. Objetivos

Los objetivos principales de este último capítulo son:

- 1- Evaluar el efecto de los productos naturales, así como de varios intermedios de síntesis, análogos bi/tricíclicos y 14-desmetil análogos, sobre la viabilidad celular de líneas tumorales (cáncer colorrectal, hepatocarcinoma, melanoma) y de macrófagos/monocitos murinos RAW 264.7
- 2- Determinar la tasa de inhibición de los productos seleccionados sobre la producción del NO y estudiar el desarrollo del ciclo celular, en los macrófagos activados con LPS, para investigar sus efectos antiinflamatorios como posibles medicamentos contra los procesos inflamatorios.
- 3- Determinar el mecanismo de acción de los compuestos más efectivos en cuanto a la actividad anticancerígena , para estudiar su potencial como agentes antitumorales .

# SECCIÓN EXPERIMENTAL



MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

Tras la primera fase de obtención de los compuestos con esqueleto de cassano y análogos, realizada en el laboratorio de Síntesis Orgánica Aplicada (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias de Granada), decidimos realizar ensayos de actividad anticancerígena y antiinflamatoria de algunas de estas sustancias. Estos fueron llevados a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (Facultad de Ciencias de Granada). De entre los compuestos sintetizados, se seleccionaron aquellos derivados cuyas estructuras fuesen susceptibles de presentar actividad antitumoral y antiinflamatoria,

### Instrumentación general básica

Cabina de flujo laminar, Estufa de cultivo, Autoclave, Espectrofotómetro, Citómetro, Microscopio óptico

### 1. Preparación de la muestra

Con el fin de preparar la muestra, se disolvieron 5 mg de cada compuesto puro en 1 ml de DMSO, Los compuestos empleados en el tratamiento celular fue disuelto previamente a su uso en DMSO a una concentración de 5 mg / ml.

Se congeló una solución stock y se almacenó a 4 ° C. Antes de los experimentos, esta solución fue diluida en medio de cultivo celular DMEM (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco-Sigma al 10 % del suero bovino fetal: SFB) hasta alcanzar las concentraciones necesarias para cada experimento.

En el resto de los ensayos de la actividad **antiinflamatoria**, se utilizaron concentraciones subcitotóxicas para asegurar que el efecto antiinflamatorio no se debe a un posible efecto citotóxico: Para la concentración de nitrito, se utilizaron concentraciones subcitotóxicas  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>, concentración que causa una reducción del 50% del crecimiento celular). Para el análisis del ciclo celular, se utilizaron las mismas concentraciones. Todos los experimentos se midieron y compararon con las células de control no tratadas después de 24, 48 o 72 h de tratamiento.

Para el ensayo **antiproliferativo**, en todas las líneas celulares se determinó la concentración de compuestos requerida para el 20%, 50% y 80% de inhibición del crecimiento celular, concentraciones de IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub>, respectivamente, para analizar el rango completo de citotoxicidad y determinar el efecto gradual o aguda de estos compuestos.

## 2. Técnicas de cultivo celular

### 2.1. Líneas celulares

Para llevar a cabo la determinación del potencial farmacéutico de nuestros compuestos, se realizaron distintos ensayos utilizando como modelo diferentes líneas celulares que fueron suministradas por el banco de células del CIC de la universidad de Granada. Para evaluar el efecto anticancerígena se emplearon B16-F10, HT29 y HepG2 y para estudiar la capacidad antiinflamatoria, se usó la Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

#### 2.1.1. Línea tumoral HT29

(ECACC: **91072201**): Línea tumoral de adenocarcinoma de colon humano de grado II. Aislada originalmente en 1975<sup>122</sup> a partir del cáncer de una mujer caucásica de 44 años de edad. Esta línea ha proporcionado un herramienta útil para el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios a partir de células epiteliales normales de intestino. Fig.14

En particular, algunas líneas celulares colorrectales tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio colónico diferenciado (por ejemplo de células absortivas o mucosecretoras), y mantienen la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*.

Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites similares a lo que ocurre en tumores colorrectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral.

En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral.

---

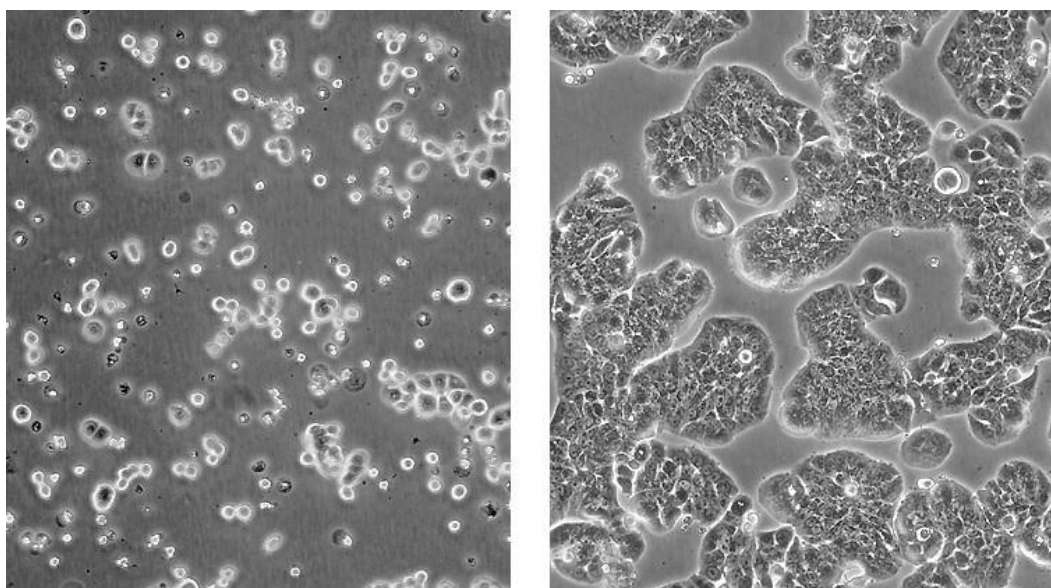
<sup>122</sup> Fogh J. TG. New Human Tumor Cell Lines. In: Fogh J. (eds) Human Tumor Cells in Vitro. (eds), Fog. Springer, Boston M, editor. Boston; 1975. 115–159 p.

La capacidad tumorigénica de esta línea celular ha sido mostrada en ratón (nude mice) formando adenocarcinomas bien diferenciados, consistentes con colon primario (grado I). Además son capaces de formar tumores en hámsters tratados con esteroides.

Esta línea celular es positiva para la expresión de los siguientes oncogenes: myc+, ras+, myb+, fos+, p53+, abl-, ros-, src-. El tiempo que estas células tardan en doblar su población es de aproximadamente 48h en condiciones normales de cultivo.

A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas: durante el crecimiento hacia postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas.

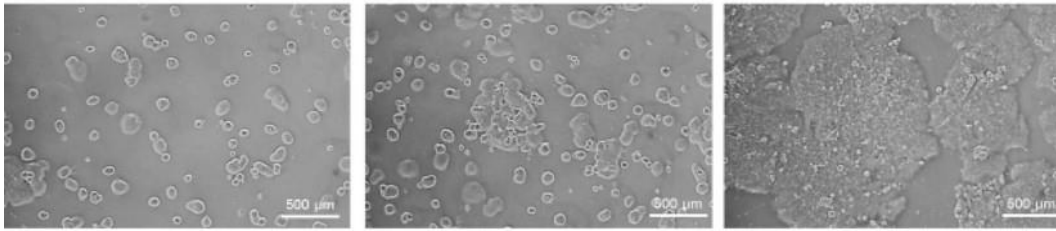
Sin embargo, el 5-10% restante de la población total desarrolla características diferenciada. Expresan enzimas como la aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), antígeno carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína membranal MUC1 así como otras mucinas <sup>123</sup>



**Figura 14a.** Morfología típica celular de un cultivo de las células HT29:  
Esquierda: Baja densidad– Derecha: Alta densidad. Barra de escala = 100µm.

<sup>123</sup> Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-secreting Cells. *Cancer Res.* 1990;50(19):6334–43.



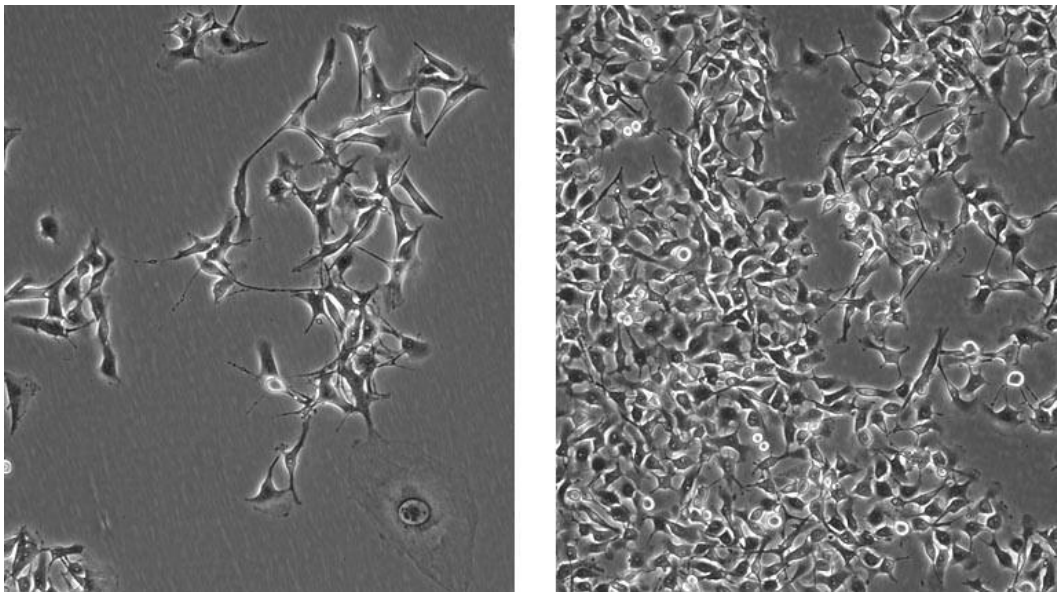


**Figura 14b.** Morfología típica celular de un cultivo de las células HT29:

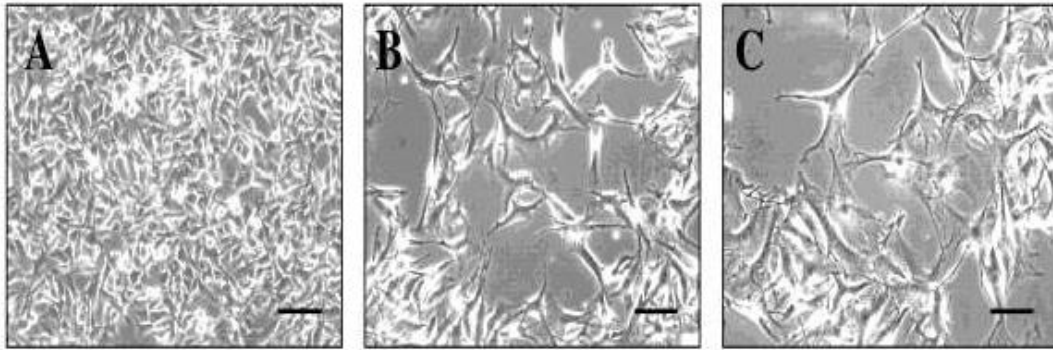
Esquierda: Baja densidad – Medio: densidad media - Derecha: Alta densidad. .Barra de escala = 500 µm.

### 2.1.2. Línea tumoral B16-F10

(ATTC: CRL-6474): Originalmente aislada de ratones (*Mus musculus*), derivada del melanoma de piel. Este tipo celular es una variante de las células de melanoma de murinos B16. Presentan un potencial metastásico superior a las células de B16. En la figura 15 se puede observar en detalle un cultivo de este tipo de células.



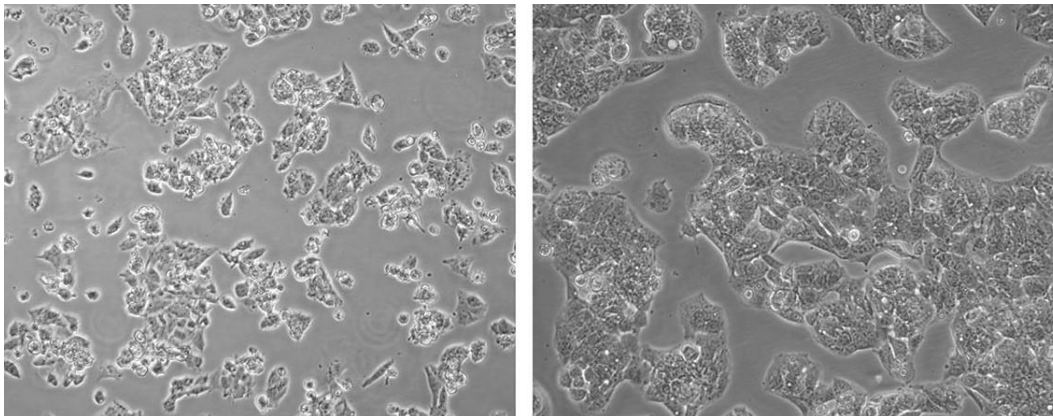
**Figura 15a.** Morfología típica celular de un cultivo de B16F10: Esquierda: Baja densidad– Derecha: Alta densidad. Barra de escala = 100 µm



**Figura 15b.** Morfología típica celular de un cultivo de B16F10: Cultivo a diferentes aumentos, de menor aumento a mayor A, B y C respectivamente. Barra de escala = 500  $\mu\text{m}$

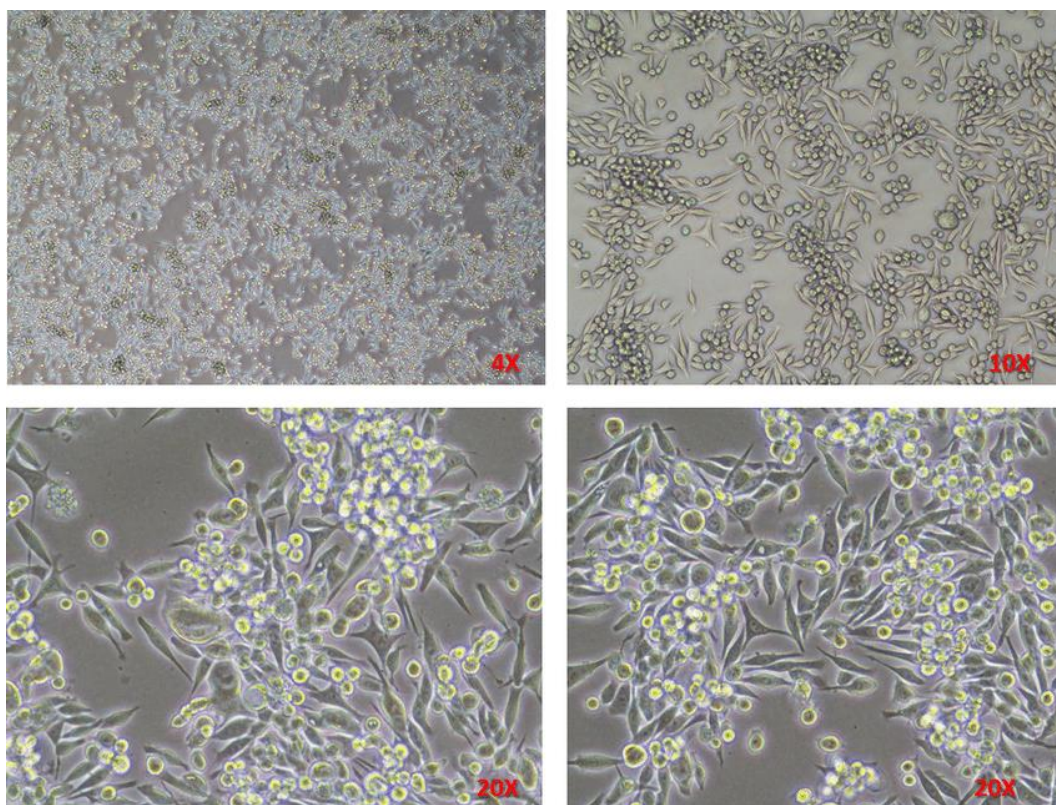
### 2.1.3. Línea tumoral HepG2

(ECACC: 85011430): es una línea permanente que se deriva del tejido del hígado de un varón caucásico de 15 años de edad con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Estas células son epiteliales en su morfología y secretan una variedad de proteínas plasmáticas importantes, por ejemplo, albúmina, transferrina y el fibronectina, proteínas de la fase aguda, alfa 2-macroglobulina, la alfa 1-antitripsina, la transferrina y el plasminógeno. Las células HepG2 constituyen un modelo *in vitro* para el estudio de polarización de hepatocitos humanos.



**Figura 16a.** Morfología típica celular de un cultivo de las células HepG2:

Esquierda: Baja densidad– Derecha: Alta densidad. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$



**Figura 16b.** Morfología típica celular de un cultivo de las células HepG2:

Cultivo a diferentes aumentos, de menor aumento a mayor.

Debido a su alto grado de diferenciación morfológica y funcional *in vitro*, las células HepG2 son un buen modelo para estudiar el tráfico intracelular y la dinámica de proteínas de la membrana canalicular y sinusoidales, y los lípidos hepáticos humanos *in vitro*. Esto puede ser importante para el estudio de enfermedades hepáticas humanas que son causadas por una incorrecta distribución subcelular de las proteínas de superficie celular, por ejemplo, defectos del transporte hepato-canalicular como el síndrome de Dubin-Johnson, la progresiva colestasis intra-hepática familiar (PFIC) y la hipercolesterolemia familiar. Las células HepG2 se utilizan también como un sistema modelo para estudios de metabolismo hepático y toxicidad de xenobióticos, detección de citoprotectores, anti-genotóxicos (del medio ambiente y la dieta) y agentes cogenotóxicos.

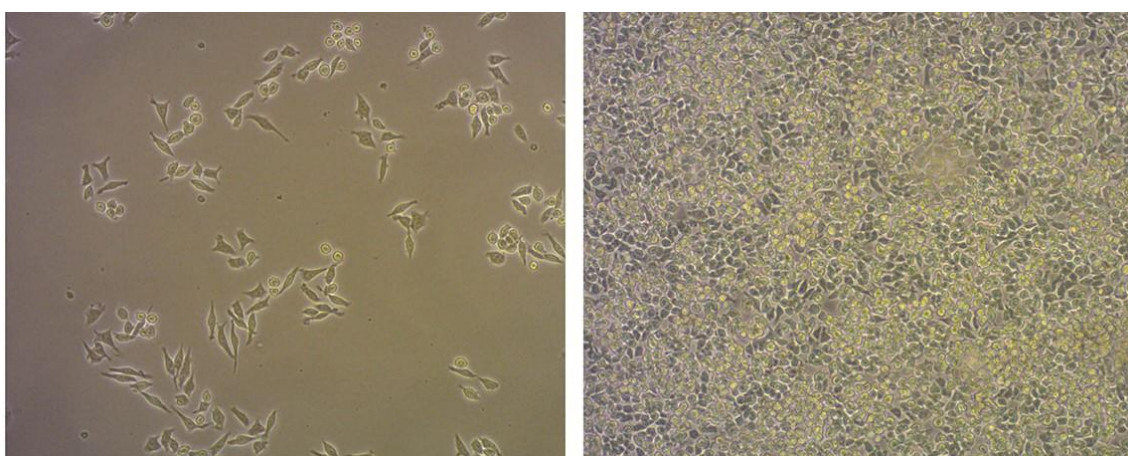
#### 2.1.4. Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

(ATCC TIB-71): Se trata de una línea celular continua de macrófagos murinos del linaje BALB/c, obtenida por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson.

Esta línea celular deriva de la línea celular monocito/macrófago RAW 264.7 obtenida por el

Dr. Peter Ralph.<sup>124</sup> y se diferencia de esta última en que necesita la presencia de lipopolisacárido (LPS) para producir óxido nítrico (NO), ya que el mero tratamiento con IFN- $\gamma$  no es suficiente. Esta propiedad hace que su comportamiento sea más parecido a macrófagos normales procedentes de diferentes cepas de ratón como por ejemplo C3H/HeN.

Las células RAW 264.7 producen una cantidad de nitritos (metabolito estable de la reacción del NO con el oxígeno,<sup>125</sup> estas células tienen capacidad fagocítica y citolítica dependiente de anticuerpo, son adherentes y crecen formando monocapa. Todas estas características hacen de RAW 264.7 (Fig.17) sea una línea celular muy adecuada para el estudio de la interacción macrófago-LPS

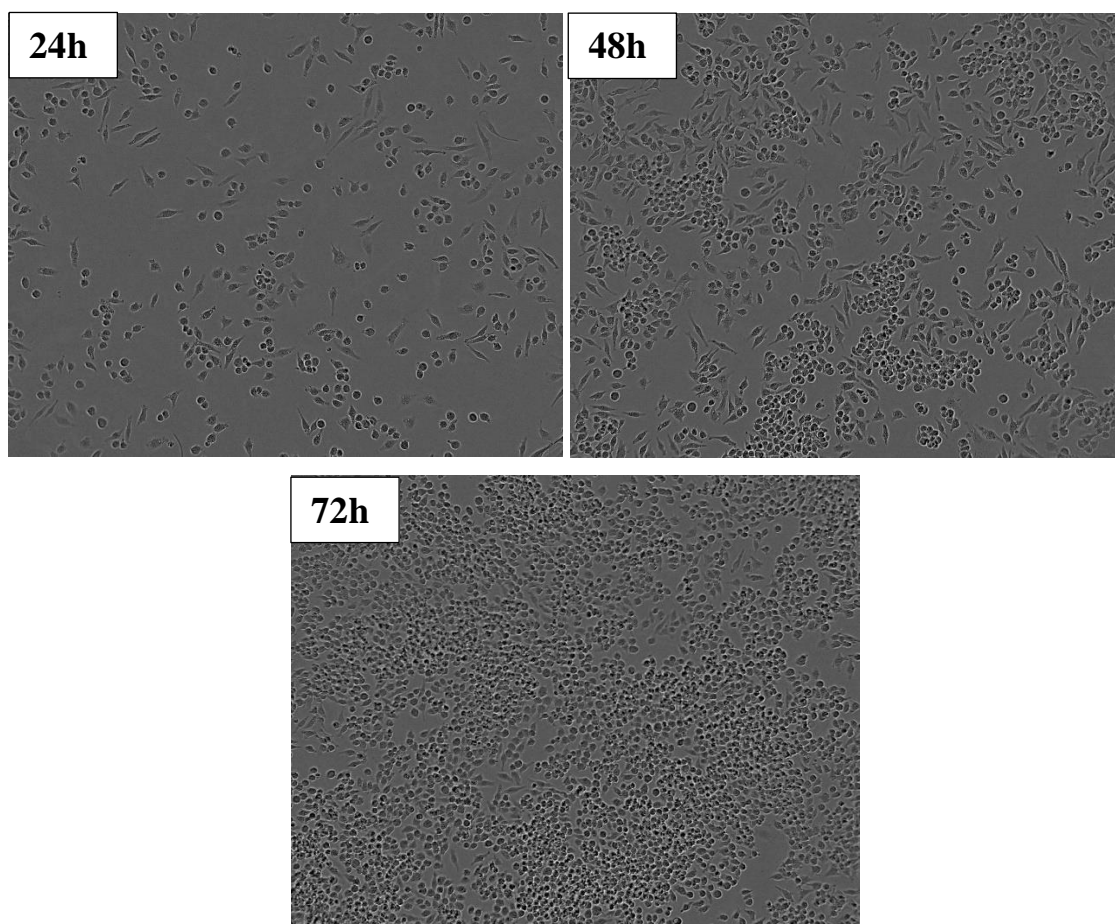


**Figura 17-a.** Morfología típica celular de un cultivo de las células RAW 264.7: Esquierda: Baja densidad– Derecha: Alta densidad. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

---

<sup>124</sup> Ralph R, Maxwell JGH. The oxygen consumption of the Antarctic lamellibranch *Gaimardia trapesina* trapesina in relation to cold adaptation in polar invertebrates . Vol. 45, Br. *Antart. Surv. Bull.* 1977. p. 41–6.

<sup>125</sup> MONCADA S, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.



**Figura 17-b.** Detalle de un cultivo de las células RAW 264.7, a diferentes tiempos 24, 48 y 72 horas respectivamente

## **2.2. Subcultivos celulares: preparación del medio de cultivo y mantenimiento**

Las distintas líneas celulares fueron mantenidas en cultivos iniciales, en placas y en flascos 25 cm<sup>2</sup>, según población celular existente. El medio de cultivo empleado fue DMEM ( glucosa 25 mM, -glutamina 2mM), Este medio fue suplementado de forma distinta según la línea celular: los cultivos de melanoma (B16-F10) y de macrófagos RAW 264.7 contenían adicionalmente suero bovino fetal (FBS) al 10% y gentamicina al 0.5%, por otro lado, los cultivos de células de adenocarcinoma de colon (HT29) y carcinoma hepatocelular humano (HepG2), contenían suero bovino fetal (FBS) al 10% y estreptomecina/penicilina al 1%. Siendo incubadas a 37°C en una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>

y 95% de humedad. Antes de suplementar el medio de cultivo con el suero bovino fetal, es calentado durante 20 -30 minutos a 55°C para inactivar el complemento y evitar que reaccione y dañe a las células. Los diferentes subcultivos se realizaron en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

Cuando las células se encontraron próximas a la confluencia (90%-95%), fueron subcultivadas: primero subcultivadas: se les retiraba el medio, seguidamente se lavaron 3 veces con PBS (tampón fosfato salino), luego fueron despegadas del soporte de incubación con tripsina -EDTA ( 0.25% de Tripsina, 1mM de EDTA, Sigma) durante 5 minutos en una estufa de cultivo. A continuación, las células fueron recogidas, centrifugadas a 15000 rpms durante 5 minutos a temperatura ambiente y sembradas para la realización de los distintos ensayos o para su mantenimiento.

### 2.2.1. Conservación de las líneas celulares

Todas las líneas celulares fueron congeladas en suero bovino fetal inactivado con un 10% de DMSO (dimetil sulfóxido). En primer lugar se congelaron a -80°C utilizando un criocontenedor de congelación gradual y a continuación fueron almacenadas a -196°. Para una descongelación rápida, los crio-tubos (1mL por cada vial) fueron inmersos en un baño a 37°C. A continuación, las líneas celulares fueron diluidas en 10 mL de medio de cultivo al 10% de FCS, e incubadas a 37°C en un incubador humificado con un 5% de CO<sub>2</sub>

### 2.2.2. Descongelación de las líneas celulares

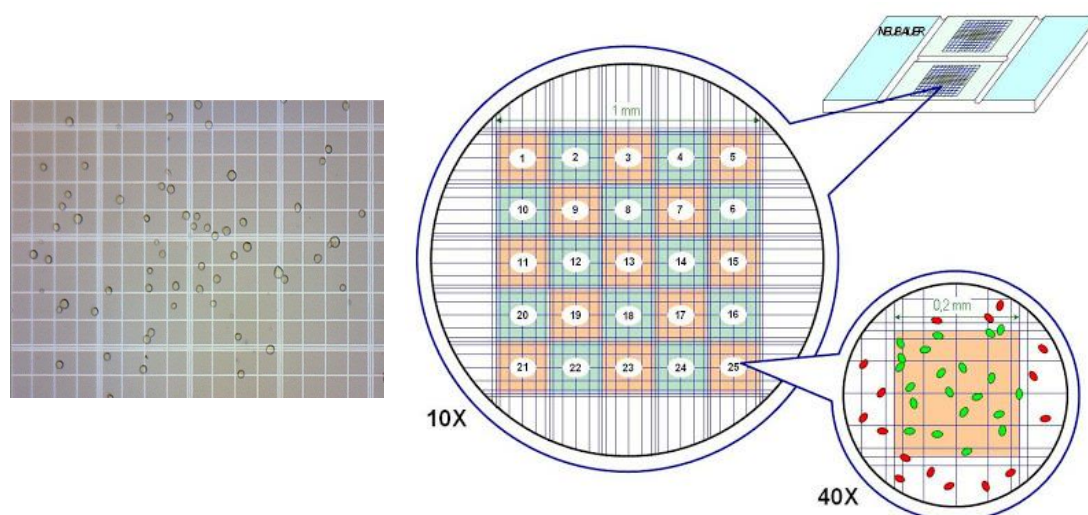
Para una descongelación rápida de las líneas celulares, los crio-tubos se sumergieron en baño a 37°C, procurando que el tapón no se moje. A continuación las células fueron diluidas en medio de cultivo, centrifugadas a 1500 rpms durante 5 minutos, sembradas en flascos de 25 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad

## 3. Métodos para la determinación de las propiedades biológicas

### 3.1. Contaje celular y Comprobación De Viabilidad

Antes de realizar los ensayos biológicos, se estableció el número de células necesarias para cada ensayo. Para ello, se efectuó una serie de medidas para determinar el número de células a sembrar. Tras el crecimiento de las células y tras alcanzar la confluencia (90%), los cultivos . se trataron con 3-5 ml de solución de tripsina al 0,025% durante 5

minutos a 37 °C, para despegar las células del frasco de cultivo. A los 5 minutos se interrumpe el proceso de tripsinización añadiendo la misma cantidad de medio de cultivo completo. Tras resuspender el medio añadido con las células, se pasa la mezcla a un tubo de 30 ml y se lleva a la centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el pellet celular. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante, que contenía tripsina, y se añadieron 4-5 ml de medio completo. De esta nueva suspensión celular, se obtiene una alícuota de 10 microlitros, a la cual se le añadirá la misma cantidad de azul de tripán y se colocaran 10 microlitros de esta mezcla en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el recuento y la comprobación de la viabilidad celular (Figura 18). Este contaje permitía establecer el volumen celular a sembrar, en los cultivos de siguientes ensayos. La formula de valoración del número de células/mL fue:



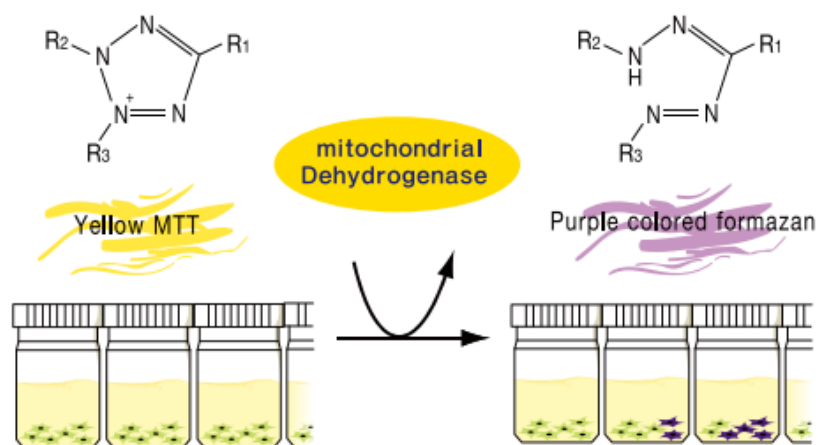
**Figura 18.** Manejo de la cámara de recuento celular Neubauer

## 3.2. Determinación de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT

### 3.2.1. Fundamento del ensayo MTT

El ensayo de viabilidad Fue realizado con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) según el método colorimétrico analítico-cuantitativo descrito por Mosmann (1983) basado en la reducción de sales sódicas de tetrazolium a formazán. El MTT es una sal de tetrazolium blanco amarillenta que es transformada en las mitocondrias de las células con capacidad metabólica a formazán, compuesto azul oscuro con un máximo de absorbancia a 570 nm proporciona al número de células viables. Esta reacción tiene

lugar cuando el MTT acepta electrones de un agente reductor o de determinadas coenzimas (tales como el NADH y el NADPH), pudiendo ser cuantificado por colorimetría.<sup>126</sup>( Fig. 19)



**Figura 19.** Reacción química de reducción del MTT por las mitocondrias para formar cristales de formazán

### 3.2.2. Protocolo del ensayo MTT

Para los ensayos de citotoxicidad las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos con 0.31 cm<sup>2</sup>/pozo, en los que no se utilizaron las hileras de los bordes para evitar contaminaciones. Se sembraron por pocillo 6·10<sup>3</sup> células HT29, células RAW 264.7 y 5·10<sup>3</sup> células B16-F10, células Hep G2. Todos los tipos celulares se hicieron crecer en 200 µL de DMEM suplementado con glutamina 2 mM, 10% en FBS y 0.1% de estreptomicina/penicilina (S/P) o 0.5% gentamicina, a 37 C y bajo una atmósfera del 5% CO<sub>2</sub>. Se utilizó DMSO como agente vehiculizante de los compuestos ensayados. Tras 24h de la siembra se retiró el medio, añadiendo medio nuevo junto con las distintas concentraciones de hasta un volumen final de 200 µL. La puesta a punto del método así como el rango efectivo de citotoxicidad de los compuestos se determinó en todas las líneas celulares.

<sup>126</sup> a) Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65:55–63. b) Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods*. 1988;20(4):309–21.



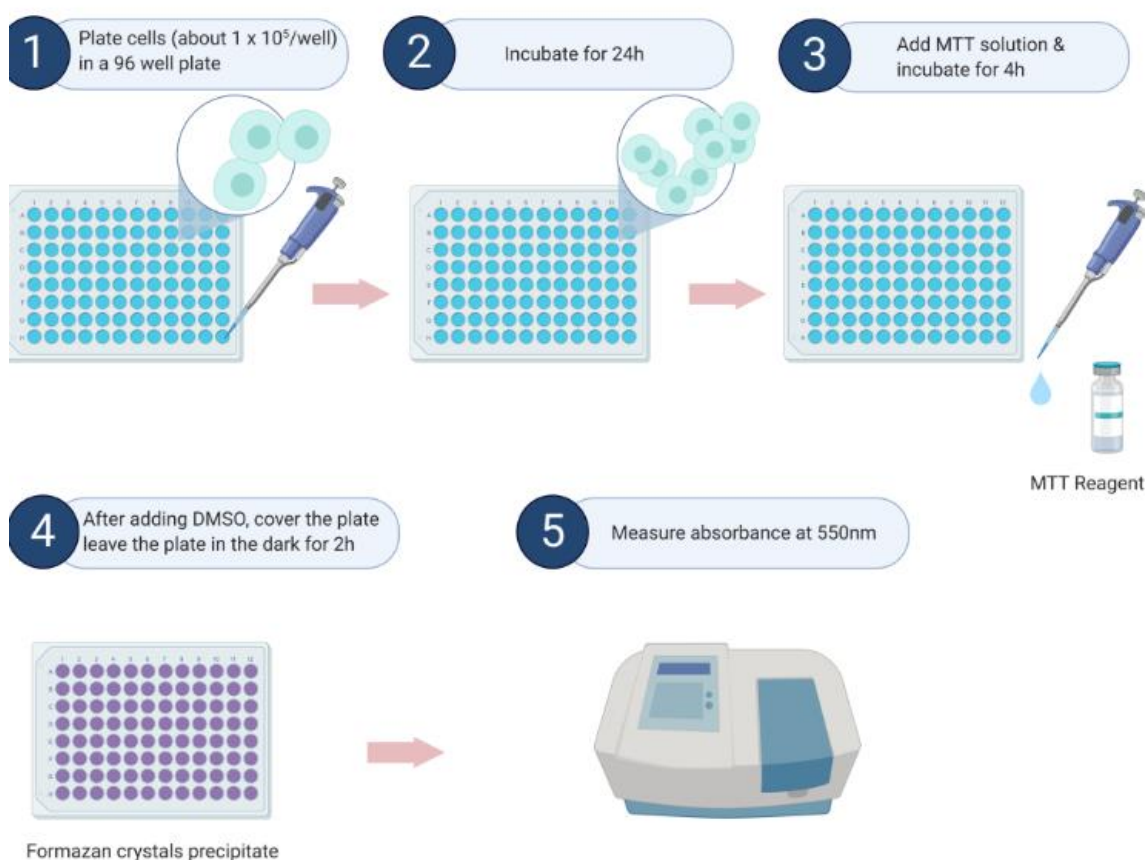
A cada tratamiento realizado, tras 24 horas de la sembra, se le retiró el medio de cultivo añadiendo nuevo medio DMED en el que se Incubaron las células con las siguientes concentraciones del producto ensayado : 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80, 90, 100 µg/mL.. Las células fueron incubadas con las distintas concentraciones de producto ensayado durante 72h. A continuación se les retiró el medio de cultivo añadiendo medio fresco con un 50% PBS y MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL, incubándose durante 1h en condiciones de esterilidad en un incubador humidificado y bajo una atmósfera Del 5% en CO<sub>2</sub>, por último, se retiró el medio y se solubilizó el formazán incorporado por las células en 100 µL de DMSO. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas tipo ELISA (Tecan Sunrise MR20–301, TECAN, Austria. Fig.20

Los resultados se mostraron como porcentaje de células vivas respecto al control. Estos valores fueron determinados como porcentaje de absorbancia respecto al valor de absorbancia control para cada concentración de compuesto en cada una de las líneas celulares, ya que los valores de absorbancia se encuentran en proporción directa con el número de células viables. Los tratamientos se realizaron para determinar la concentración de los compuestos a la que se produce una inhibición del crecimiento del cultivo de un 20%, 50 % y 80% (IC20 , IC50 , IC80), en cada línea celular en presencia o no de los compuestos ensayados. Con los resultados obtenidos se realizaron las diferentes curvas de citotoxicidad en las líneas celulares anteriormente descritas y los distintos tratamientos in vitro. El efecto, producido por un citotóxico, sobre la viabilidad celular puede ajustarse a una curva sigmoidea la cual viene dada por la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{a}{1 + (x/L)^s}$$

Donde ‘y’ representa la viabilidad como porcentaje de células vivas respecto al control y ‘x’ la concentración de maslínico utilizada. Siendo ‘a’, ‘L’ y ‘s’, los parámetros ajustables de la curva. En esta curva pueden distinguirse claramente tres zonas: En primer lugar, una zona plana, donde la concentración de droga no es lo suficientemente elevada para producir efectos citotóxicos apreciables; en segundo lugar, una zona de transición, en la cual pequeñas variaciones de la concentración provocan importantes efectos en la viabilidad celular, siendo ésta la zona donde suele encontrarse la IC50; y por último, una segunda zona plana donde la concentración de maslínico se encuentra por encima de la IC50, en la que la citotoxicidad es lo suficientemente elevada como para que la viabilidad se acerque asintóticamente al 0%. Tras ajustar los datos obtenidos experimentalmente a la curva teórica por regresión no lineal,

se obtuvieron los distintos valores para los parámetros ajustables, así como sus desviaciones estándares



**Figura 20.** Esquema ilustrativo del protocolo del ensayo MTT.

### 3.3. Determinación de la actividad antitumoral mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es uno de los métodos más específicos en el estudio integrado de los eventos morfológicos y moleculares ocurridos durante la muerte y proliferación celular. El método se basa en hacer pasar una suspensión de células por delante de un haz de láser de un citómetro, provocando que el impacto de cada célula con el rayo de luz, emita ciertas señales que serán recogidas y digitalizadas. En teoría Las aplicaciones de esta técnica son múltiples, muestran de forma simultánea información sobre la morfología de la célula, fenotipo, estatus de la cromatina y análisis del DNA (ciclo celular), estudios de inducción de apoptosis e incluso la expresión intracelular de proteínas, etc. El marcaje

de las células con distintos fluoróforos lo que hace posible determinar el mecanismo de muerte celular y la posición del ciclo celular en las que las células se encuentran. Todo ello hace posible determinar la aparición de distintas poblaciones celulares.

### 3.3.1. Estudio del ciclo celular

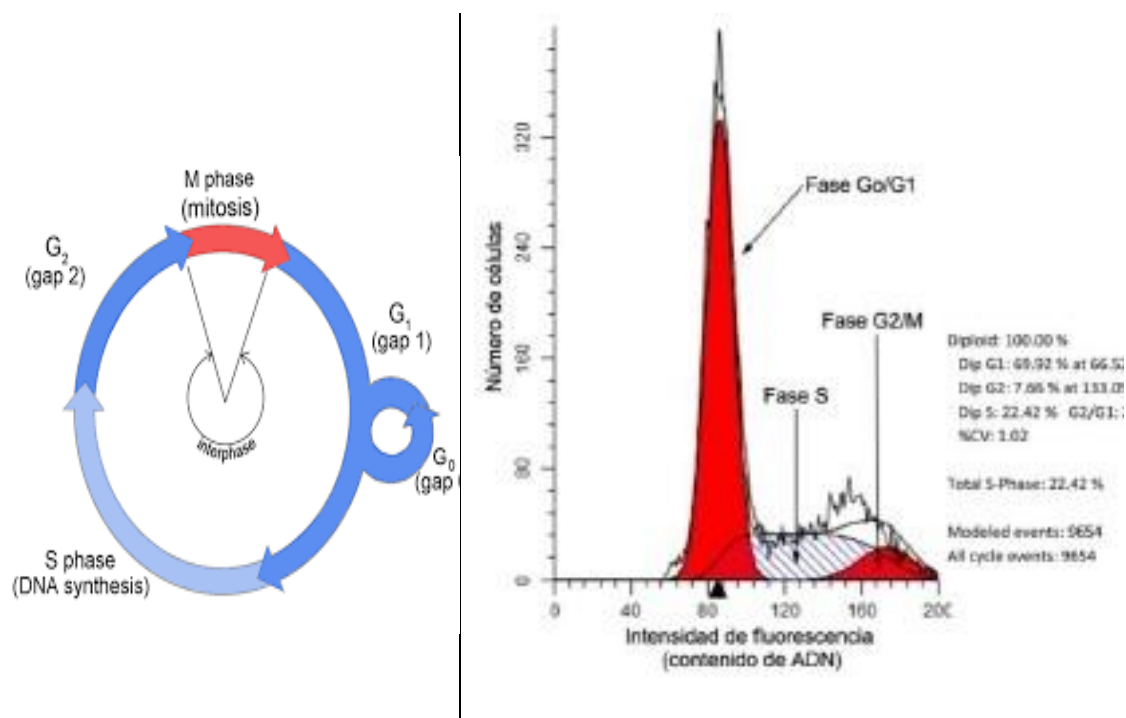
#### A) Fundamento

La cantidad de ADN de una célula se analiza por citometría, para determinar la presencia de células con una alteración del contenido de ADN, obteniendo así, el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Las células normales poseen una cantidad de ADN conocida. Así, en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, la célula posee un contenido diploide de ADN, en la fase S, la célula duplica su material genético siendo tetraploide, en la fase G<sub>2</sub> y al inicio de la mitosis, la célula mantiene este doble contenido de ADN hasta que se divide en dos células hijas, presentando ambas células hijas un contenido de ADN diploide.

La medida del contenido en DNA se ha utilizado también para determinar el grado de haploidía de las células malignas, así como su grado de proliferación según el porcentaje de células que se encuentran en fase S.

En una población de células normales cancerígenas, el porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> se encuentra cercano al 90%. En el estadio G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular la carga cromosómica está formada por el número de cromosomas propio de la especie a la que la población celular pertenece, en el resto de fases se está adquiriendo material cromosómico o se ha alcanzado la cantidad doble para entrar en mitosis, estas son las fases S y G<sub>2</sub>/M. Por lo que un histograma representativo de una población normal posee un pico alto a un valor de 2C correspondiente a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, una fase de meseta correspondiente a la fase S, en la que se encuentran sintetizando DNA y un tercer pico G<sub>2</sub>/M en el que las células se encuentran en el estadio próximo a la mitosis.

El método usado para cuantificar la cantidad de ADN en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría, es el marcaje con yoduro de propidio, capaz de integrarse en el ADN. Los resultados obtenidos se recogen en una serie de histogramas (Fig. 21) comparados con los de poblaciones celulares control (células no tratadas).



**Figura 21.** Derecha : Fases del ciclo celular. Izquierda: Histograma del ciclo celular

## B) Técnica

El ciclo celular fue analizado por citometría de flujo, utilizando un contador activado por fluorescencia (FACS, fluorescence activated cell sorter). Mediante este análisis podemos determinar el número de células en cada uno de los tres estados del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M <sup>127</sup>. El ensayo fue llevado a cabo tras 72h de tratamiento con la dienona **91** y el hidroxialdehído **97** a la dosis de IC<sub>50</sub> y a la dosis superior IC<sub>80</sub> (concentración en la que se inhibe el crecimiento celular en un 80%). Este ensayo fue realizado en las células B16F10. Que fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células / pocillo, con 1,5 mL de medio (DMEM, 10% FBS, 0.1% S/P, y después fueron incubadas durante 24 horas.

Tras 24h de la siembra, se les cambió el medio, añadiendo medio fresco tratándolas o no (control) con los productos a ensayar siendo incubadas durante 72h. Las dosis utilizadas fueron los respectivos valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub> para estas células.

<sup>127</sup> Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and JD. Molecular Cell Biology, 4th edition. 4th ed. Freeman NYWH, editor. Vol. 14. New York; 1995.

Tras la incubación, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas siendo recogidas por centrifugación a 1500 rpm for 5 min. El pellet fue resuspendido en 1 x TBS (Tris 10 mM y NaCl 150 mM), posteriormente, se añadió tampón Vindelov (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, 10 mg / ml de ARnasa y 1 mg / ml de PI, a pH 8). Las células se almacenaron en hielo y, justo antes de la medición, se tiñeron con 20 µl de solución de PI de 1 mg / ml. Aproximadamente, se analizaron  $10 \times 10^3$  células en cada experimento. Los experimentos fueron realizados tres veces con dos repeticiones por ensayo, incluso el control. Finalmente, las muestras se analizaron con un citómetro de flujo a 488 nm. El análisis FACS fue realizado en un citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporation, Hialeah, FL, EE. UU. ). El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculado utilizando el programa Multicycle (Phoenix Flow System, San Diego, CA, USA)

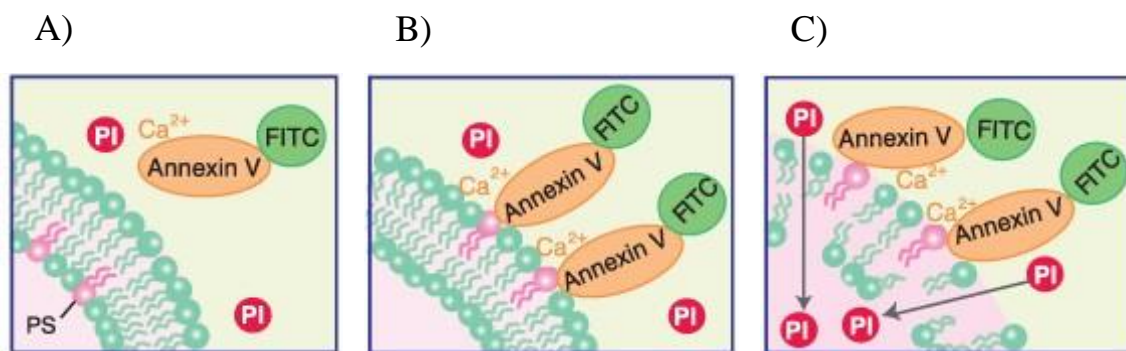
### 3.3.2. Estudio de la apoptosis

#### A) Fundamento

Durante el proceso de la apoptosis, se producen cambios generales en el interior de la célula apoptótica como otros cambios específicos en su superficie. La mayoría de estos cambios puede ser detectada mediante citometría de flujo.

Entre estos cambios merecen ser destacados aquellos cambios que ocurren en la superficie de la célula apoptótica: la exposición de proteínas con carbohidratos que mantienen el ácido siálico terminal (proteínas inmaduras), así como la alteración en la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática. La fosfatidilserina es expuesta en esta fase de la apoptosis en una proporción mayor a lo habitual en la monocapa externa de la membrana plasmática de la célula apoptótica.

La interacción de la fosfatidilserina en la superficie de estas células con los receptores de fosfatidilserina que se encuentran en los macrófagos, indican a estos últimos el inicio de la fagocitosis de la célula apoptótica. La exposición de fosfatidilserina es utilizada para la cuantificación por citometría de flujo.

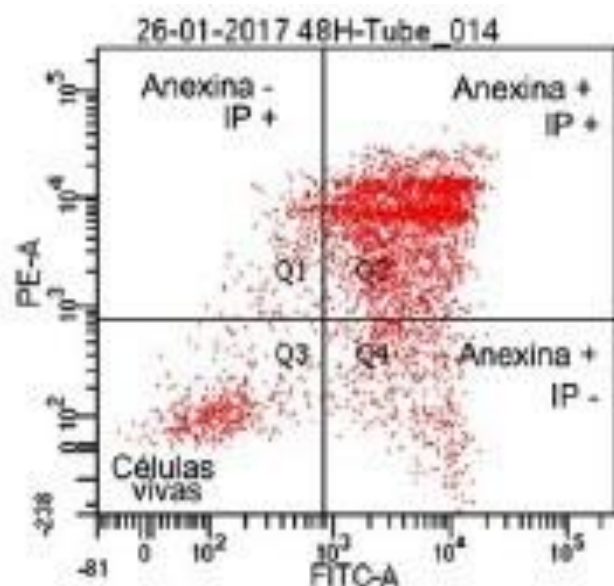


**Figura 22.** A) La anexina V y el PI no pueden unirse a la membrana celular y al ADN, respectivamente. B) La anexina V se une a la PS que está expuesta a la membrana externa, pero la PI no puede penetrar en las células. C) La anexina V se une a la PS que está expuesta a la membrana externa y la PI interactúa con el ADN

El marcaje con yoduro de propidio (IP) es proporcional al contenido de ADN siendo también cuantificado por citometría, en este caso, da informaciones sobre la integridad de la membrana celular. Este doble marcaje permite distinguir distintos estados de la célula. Fig. 22

El método utilizado es un doble marcaje de las células tratadas y no tratadas, con anexina V-FITC/Ioduro de propidio. La anexina V-FITC, se caracteriza por estar conjugada con isotiocianato de fluoresceína capaz de interactuar de forma específica con la fosfatidilserina, pudiéndose cuantificar el grado de apoptosis.

La apoptosis se detectó por citometría de flujo (FACS) mediante el ensayo de unión específica de la anexina V-FITC a la fosfatidilserina (Anexina V-FITC kit; Bender MedSystems, Vienna, Austria), combinado junto con el marcaje con IP. Utilizando este método puede distinguirse entre células con apoptosis temprana (anexina V positivas, IP negativas), apoptosis tardía (anexina V positivas, IP positivas) y necrosis (anexina V negativas, IP positivas). Fig. 23



- Células con **apoptosis temprana**:  
anexina V positiva / IP negativa (**Q4**).

- Células con **apoptosis Tardía**:  
anexina V positiva / IP positiva (**Q2**)

- Células con **necrosis**:  
anexina V negativa / IP positiva (**Q1**).

-Células normales: (**Q3**)

**Figura 23.** Diagrama en el que se observa los datos de apoptosis obtenidos por citometría de flujo, mediante el marcaje con anexina V-FITC/ ioduro de propidio (IP).

## B) Técnica

Para realizar este ensayo, fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células B16-F10 en placas de 24 pocillos con 1,5 ml de medio y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con la dienona **91** y el hidroxialdehido **97**, por triplicado durante 24, 48 y 72 h las dosis utilizadas fueron los respectivos valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ . A continuación las células las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas siendo recogidas por centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. A continuación las células fueron resuspendidas en “binding buffer” (HEPES / NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  2,5 mM), al que se le adicionó la anexina V-FITC (1  $\mu$ g / ml) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Justo antes del análisis por citometría de flujo, las células fueron tintadas con 5  $\mu$ l de solución de PI de 1 mg / ml. En cada experimento, se analizaron aproximadamente  $10 \times 10^3$  células y el experimento fue repetido dos veces con dos repeticiones por ensayo, incluso el control.

El análisis FACS fue realizado a 488 nm en un citómetro de flujo a FACScan (fluorescence-activated cell sorter) flow-cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA), analizando entre 5000 y 10,000 eventos.

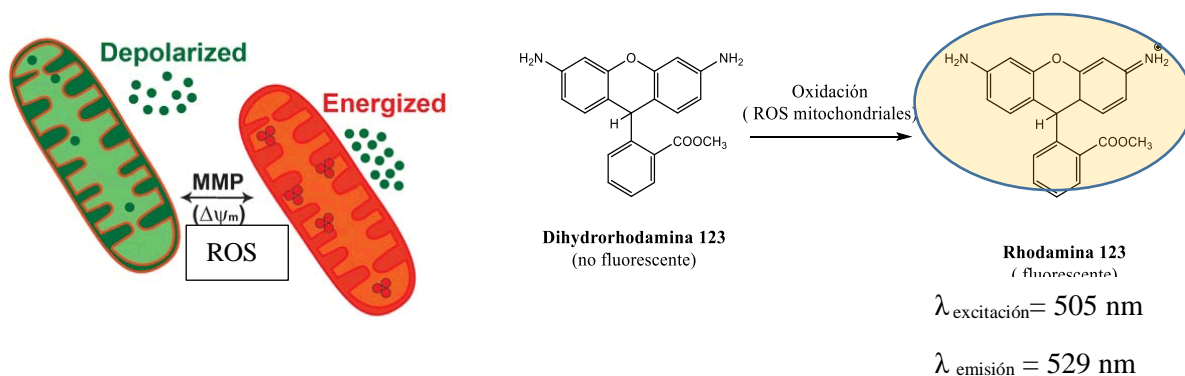
### 3.3.3. Estudio del cambio de potencial de la membrana mitocondrial

#### A) Fundamento

El daño oxidativo se estudió mediante análisis citoquímico del potencial de la membrana mitocondrial, con dihidrorhodamina 123 (DHR).

La DHR, es capaz de oxidarse en contacto con las células vivas, formándose un producto altamente fluorescente, denominado rodamina (Rh 123). La formación de este compuesto puede ser monitorizada por espectroscopía de fluorescencia, usando longitudes de onda de excitación y emisión de 500 y 536 nm respectivamente. Este ensayo se realiza mediante citometría de flujo, donde la intensidad de fluorescencia de Rh 123, junto con la tinción de yoduro de propidio, aporta información sobre los cambios que puedan ocurrir en el potencial de la membrana mitocondrial.

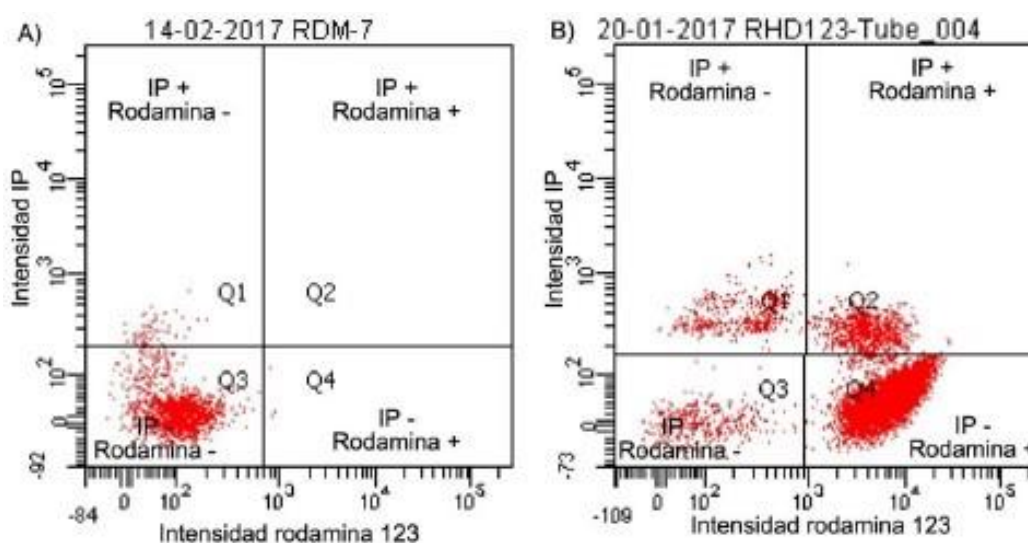
En la membrana mitocondrial existe un trasiego de electrones que mantienen el potencial de membrana. La DHR tiene especificidad por la mitocondria, capaz de captar radicales libres provocados por ese trasiego de electrones. Cuando la DHR capta un radical libre se oxida, dando lugar a Rh 123, la cual emite fluorescencia. Si no existen radicales libres debido a una alteración en el potencial de membrana, no se produce fluorescencia. La fluorescencia puede ser captada mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos, aportan la siguiente información: Fig. 24



**Figura 24.** Fundamento de técnica de tinción con Rhodamina



- Si hay apoptosis y la tinción con rodamina es positiva, el potencial de membrana permanece intacto. Esta consecuencia da a entender que la membrana mitocondrial está intacta y la ruta de la apoptosis puede estar determinada por la vía de apoptosis extrínseca.
- Si hay apoptosis y la tinción con rodamina es negativa, el potencial de membrana se ve alterado provocando que la mitocondria se vuelva permeable. Este resultado indica, que la apoptosis puede estar determinada por la vía de apoptosis intrínseca.



**Figura 25.** Análisis por citometría del cambio de potencial de membrana mitocondrial. A) Compuesto que induce apoptosis por vía intrínseca, B) Compuesto que induce apoptosis por vía extrínseca.

### B) Técnica

El gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial se estudió mediante citometría de flujo analítica, utilizando dihidrorrodamina (DHR). Para ello, fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células B16-F10 en placas de 24 pocillos, fueron incubadas durante 24 horas y después fueron expuestas durante 48 horas a diferentes dosis de la dienona **91** y el hidroxialdehído **97**, las concentraciones utilizadas fueron los respectivos valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ . A continuación el medio de cultivo fue renovado añadiendo medio fresco con DHR hasta una concentración final de 5 mg / ml. Las células fueron incubadas después durante 1 ha 37 °C en una atmósfera de  $CO_2$  al 5% y humedad del 95%, y posteriormente fueron lavadas y resuspendidas en PBS con 5  $\mu$ g / mL de PI.

La intensidad de la fluorescencia fue medida usando un citómetro de flujo a FACScan (fluorescence-activated cell sorter) flow-cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA), analizando entre 4000 y 10,000 eventos. Todos los experimentos fueron realizados tres veces con dos repeticiones por ensayo, incluso el control.

### 3.4. Determinación de la actividad antiinflamatoria

#### 3.4.1. Determinación de la producción del óxido nítrico en los macrófagos murinos RAW 264.7

##### A) Fundamento

En la respuesta antiinflamatoria, además de fagocitar, uno de los mecanismos los más importantes y ejecutados por los macrófagos es la producción de una gran variedad de productos tóxicos para contener y tratar de matar el patógeno. Los más tóxicos directamente para los microorganismos son: óxido nítrico (NO), el anión superóxido ( $O^{2-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El óxido nítrico es producido principalmente por la forma inducible de la NO sintasa (iNOS), el anión superóxido es generado por una oxidasa NADPH asociada a la membrana celular, en un proceso conocido como “estallido respiratorio” (oxidative burst) porque va acompañado de un incremento transitorio del consumo de oxígeno y es convertido por la superóxido dismutasa en  $H_2O_2$ .<sup>128</sup>

La inducción de NO es un indicador principal en la evaluación de las actividades inflamatorias, los macrófagos activados pueden generar NO y está involucrado en algunos trastornos inflamatorios como la artritis reumatoide, la hepatitis crónica y la fibrosis pulmonar.<sup>129</sup>

Una forma indirecta de medir el NO (óxido nítrico), índice de la actividad óxido nítrico sintasa, es mediante la cuantificación de uno de sus metabolitos estables, los nitritos. Este ensayo se basa en una reacción de diazotización descrita por primera vez por Griess en

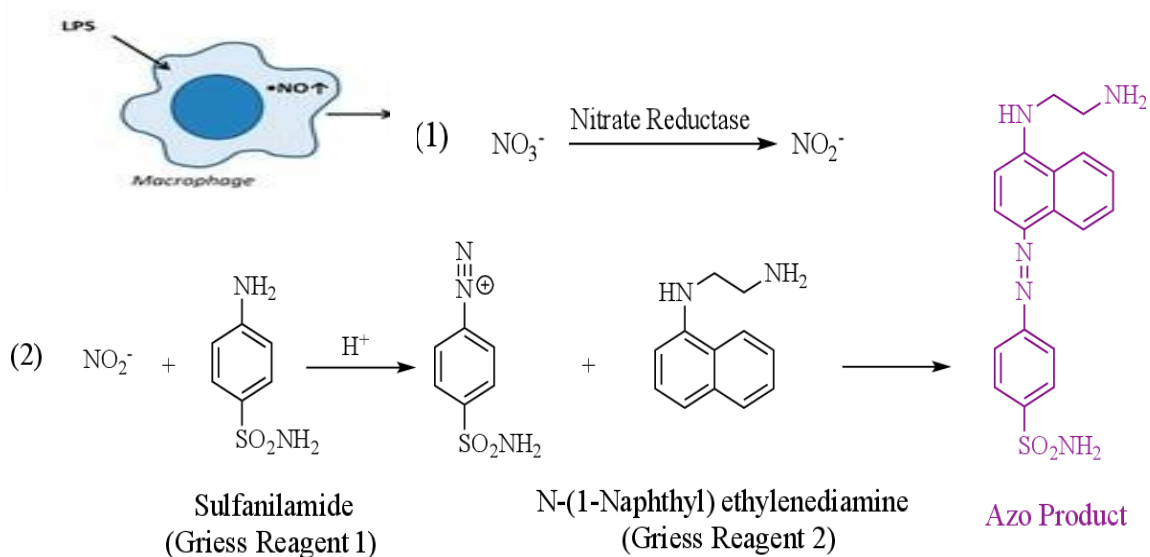
---

<sup>128</sup> Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport and MJS. Immunobiology, 5th edition The Immune System in Health and Disease . 5th ed. Science Garland, editor. New York.: Garland Science; 2001.

<sup>129</sup> Kanwar J, Kanwar R, Burrow H, Baratchi S. Recent Advances on the Roles of NO in Cancer and Chronic Inflammatory Disorders. *Curr Med Chem.* 2009;16(19):2373–94.

1987, en la cual el agente  $\text{N}_2\text{O}_3$ , generado de la autooxidación del NO o de la acidificación de  $\text{NO}_2^-$ , reacciona con la sulfanilamida para dar lugar a un derivado de diazonio que reacciona con la naftiletildiamina, (NED). Se forma un producto coloreado diazo que absorbe fuertemente a 540 nm y se determina espectrofotométricamente <sup>130</sup>.Fig.25

El lipopolisacárido (LPS, un componente de la pared celular de una bacteria Gram negativa) es un potente activador de macrófagos que inhibe la proliferación de macrófagos (induce la detención del ciclo celular) y estimula la producción de óxido nítrico (NO) a través de la NO sintasa II (NOSII).



**Figura 26.** : Reacción de Griess en macrófagos activados por LPS

Las células de macrófagos murinos RAW 264.7 estimuladas con LPS se emplean con frecuencia como modelo de células inflamatorias clásicas, ya que puede producir la mayor liberación de NO durante la respuesta inflamatoria.

<sup>130</sup> Tarpey P, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, Cox C, et al. Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2004;75(2):318–24.

### B) Técnica

Para este ensayo, las células RAW264.7 fueron sembradas a  $6 \times 10^4$  células / pocillo en placas de cultivo celular de 24 pocillos y fueron suplementadas con  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  de lipopolisacárido (LPS). Después de 24 h de estimulación, las células fueron incubadas durante 72 h con los compuestos objeto de estudio, en concentraciones subcitotóxicas, respectivas a valores de  $\frac{3}{4} \text{IC}_{50}$ ,  $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$ ,  $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$ .

Los sobrenadantes fueron recogidos a las 24 h, 48 h y 72 h para determinar su concentración de nitrito y / o se almacenaron a  $-80^\circ \text{C}$  para su uso posterior.

Una vez dispuestas las muestras, la reacción de Griess fue realizada tomando  $150 \mu\text{L}$  del sobrenadante o el estándar de nitrito de sodio ( $0\text{-}120 \mu\text{M}$ ) y fueron mezclados con  $25 \mu\text{L}$  de reactivo A de Griess ( $0,1\%$  NN- (1-naftil) -etilendiaminodihidrocloruro) y  $25 \mu\text{L}$  de reactivo B de Griess (Sulfanilamida al  $1\%$  en ácido fosfórico al  $5\%$ ), en placa de 96 pocillos. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a  $540 \text{ nm}$  en un lector de placas ELISA (Tecan Sunrise MR20-301, TECAN, Austria). La absorbancia se refirió a la curva estándar de nitrito para determinar la concentración de nitrito en el sobrenadante de cada muestra experimental. A continuación, el porcentaje de producción de NO fue determinado asignando el  $100\%$  al incremento entre el control negativo (células no tratadas) y el control positivo (células tratadas solo con  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  de LPS).

El porcentaje de inhibición de la producción de NO se calculó mediante la siguiente ecuación: Donde el control negativo representa las células no tratadas y el control positivo representa las células fueron tratadas solo con  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  de LPS)

$$\% \text{ NO}_{\text{producción}} = (\text{C}^{\text{N}}_{\text{compuesto}} - \text{C}^{\text{N}}_{\text{control negativo}}) / (\text{C}^{\text{N}}_{\text{control positivo}} - \text{C}^{\text{N}}_{\text{control negativo}}) \times 100$$

$$\% \text{ NO}_{\text{Tasa de inhibición}} = 100 - \% \text{ NO}_{\text{producción}}$$

### 3.5. Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante citometría de flujo: Estudio del ciclo celular

La citometría de flujo es un método novedoso y rápido para determinar de manera eficiente y reproducible el contenido relativo de ADN, la ploidía y para medir alteraciones en los perfiles del ciclo celular. Como se mencionó con anterioridad (sección 5.1) El contenido

de ADN es directamente proporcional a la fluorescencia del PI, lo que permite determinar el porcentaje de célula en cada fase del ciclo celular. De esta forma, pudimos visualizar subpoblaciones celulares, con diferentes contenidos de ADN, utilizando en un citómetro de flujo a FACScan (fluorescence-activated cell sorter) flow-cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA), a 488 nm, analizando entre 5000 y 10,000 eventos. Los cambios en los niveles de ADN son característicos de la detención del ciclo celular y la diferenciación celular.

Para este ensayo fueron sembradas  $12 \times 10^4$  células RAW264.7 de macrófagos / monocitos murinos estimuladas con LPS en placas de 24 pocillos con 1,5 mL de medio y fueron incubadas con la dienona **91** y el hidroxilaldehído **97**, durante 24 h, a concentraciones respectivas a los valores de  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub> y  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>. Se analizaron varios controles de forma paralela; se realizó un control positivo con células tratadas únicamente con LPS (estimuladas), y un control negativo donde se las células RAW264.7 fueron expuestas a la dienona **91** y el hidroxilaldehído **97**, sin que fueran estimuladas con LPS.

Tras la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y tripsinadas, a continuación fueron resuspendidas en TBS 1X (Tris 10 Mm, NaCl 150 Mm). Posteriormente se añadió el tampón Vindelov (Tris 100 mM, NaCl 100 Mm, Rnasa 10 mg / mL, 1 mg). / mL PI, pH 8). Las muestras fueron reposadas durante 15 min en hielo y fueron tintadas, inmediatamente antes del análisis FACS, con 20  $\mu$ L de solución de PI de 1 mg / ml.

Los datos fueron analizados para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0 / G1, S y G2 / M).

#### **4. Análisis estadístico de los resultados**

Los datos experimentales de citotoxicidad fueron ajustados a una función sigmoidea ( $y = y_{\max} / (x / a)^b + 1$ ) mediante regresión no lineal. Los valores de IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>80</sub> (concentraciones que causan un 80%, 50% y 20% de inhibición de la viabilidad celular, respectivamente) y fueron obtenidos por interpolación. Estos análisis fueron realizados con el software SigmaPlot® 12.5.

Análisis similares fueron realizados para obtener la IC<sub>50</sub> de la producción del NO.

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos que se presentan en el apartado de “Resultados”, fueron representativos de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado, todos los datos cuantitativos fueron resumidos como la media  $\pm$  de la desviación estándar (DE).

# RESULTS

## 1. Anti-cancer activities

### 1.1. Cancer cell proliferation assay

Chemotherapy has been recommended as the relatively effective strategy to improve the survival status of patients with ovarian cancer, gastric cancer, and lung cancer. etc. Therefore, it is imperative to develop new drugs for cancer treatment.

The newly-synthesized diterpenoids were evaluated to investigate their cytotoxic effect against selected three tumor cell lines. B16-F10 murine melanoma cells. HT29 human colon adenocarcinoma cells, and Hep-Ge2 human hepatoma carcinoma cells. The synthesized compounds were submitted to a MTT assay for the screening, of cell viability with increasing concentrations of the studied compounds (ranging from 0 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ), by formazan dye uptake and expressed as percentage with respect to untreated control cells. In these three cell lines, the concentrations (expressed in  $\mu\text{g/mL}$ ) of compounds required for 50% growth inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) were determined for each compound on these three cell lines, after 72h of treatment. (Tables (14 –18)).

The selected products were divided into 4 groups according to their synthesis sequences:

**Group I:** Selected compounds from the taepeenin F synthetic sequence: (only those compounds that present methyl group at C-14 (cassane skeleton): **17, 91, 94, 97, and 98.**

**Group II:** After obtaining the compounds with cassane skeleton in the (5 $\alpha$ )-vouacapane-8(14).9(11)-diene (**16**) synthetic pathway, tricyclic and tetracyclic diterpenes with a substitution of methyl or COOMe group on C-14 position were chosen: **16, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109 and 110.**

**Group III:** The five synthesized 14-desmethyl cassane -type diterpenoid analogues: **119, 120, 121, 122 and 123.**

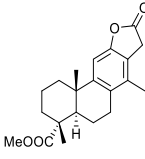
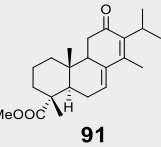
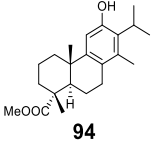
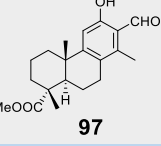
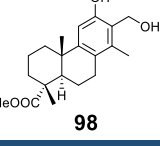
**Group IV:** Bicyclic or tricyclic cassane -type diterpenoid analogues: **126, 127, 128, 129, 130, 131 and 132**

All the tested compounds. Induced a dose-dependent decrease in the viability of cells after 72 h of treatment and displayed cytotoxicity in the conditions assayed (range 0 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ) with  $\text{IC}_{50}$  data between 2.55 and 133.94  $\mu\text{g/mL}$ .



## 1.1.1. Cytotoxicity of group I compounds:

**Table 12:** Growth-inhibitory effects of **Group I** compounds on the three cancer cell lines

ENTRY	PRODUCT	IC <sub>50</sub> µg/mL		
		HT29	Hep-G2	B16-F10
1	 <b>17</b>	133.94 ± 13.53	90.32 ± 3.32	87.88 ± 8.22
2	 <b>91</b>	11.50 ± 0.74	6.36 ± 1.62	7.63 ± 0.42
3	 <b>94</b>	76.54 ± 7.69	47.25 ± 4.75	45.67 ± 2.81
4	 <b>97</b>	6.63 ± 0.21	12.50 ± 1.85	2.55 ± 1.29
5	 <b>98</b>	28.44 ± 1.71	41.57 ± 0.81	33.76 ± 1.45

The best results were achieved by compound **91** and **97** with IC<sub>50</sub> concentrations lower than 12 µg/mL in the three cancer-cell lines. The most active compound was **97**. The best result was observed for hydroxyaldehyde **97** against B16-F10 cells with the lowest IC<sub>50</sub> value of 2.55 ± 1.67 µg/mL. The results showed also that taepeenin F (**17**) does not display an important cytotoxicity effect in all the three studied cell lines with IC<sub>50</sub> range between 87.88 and 133.94 µg/mL. In this context, there is no available data about the biological activity of taepeenin F up until now, witch deserve to be highlighted.

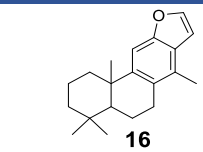
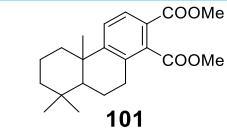
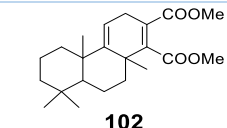
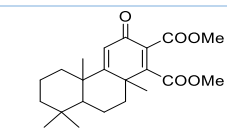
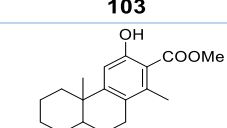
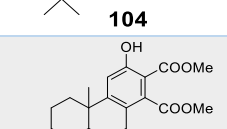
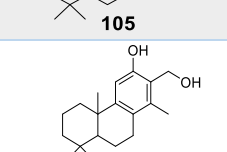
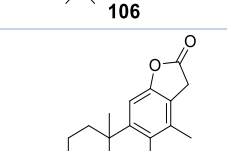
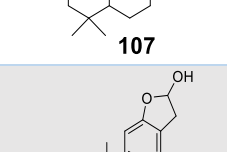
Compounds **94** and **98** showed relative cytotoxicity in the three cell lines with IC<sub>50</sub> data range between 46.25 and 76.54 µg/mL for the phenol **65** and between 28.44 µg/mL and 41.57 µg/mL for the diol **70**.

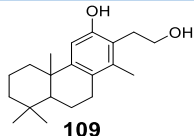
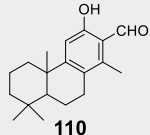
The optimal results were observed for compounds **91** and **97**. The highest activity was evidenced by hydroxyaldehyde **97**, with an IC<sub>50</sub> values of 2.55 µg/mL versus 7.63 µg/mL

for the dienone **91** in B16-F10 cells. 6.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  versus 11.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in HT-29 cells, and 12.50 Vs 6.36 in HepG2 cell line

### 1.1.2. Cytotoxicity of group II compounds:

**Table 13:** Growth-inhibitory effects of **group II** compounds on the three cancer cell lines

Entry	PRODUCT	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$		
		HT29	Hep-Ge2	B16-F10
1	 <b>16</b>	20.66 $\pm$ 1.09	13.96 $\pm$ 0.50	31.73 $\pm$ 1.10
2	 <b>101</b>	15.43 $\pm$ 2.72	33.77 $\pm$ 0.80	9.25 $\pm$ 0.74
3	 <b>102</b>	25.29 $\pm$ 0.89	58.32 $\pm$ 0.32	13.01 $\pm$ 1.80
4	 <b>103</b>	11.89 $\pm$ 0.80	26.72 $\pm$ 0.88	6.01 $\pm$ 0.41
5	 <b>104</b>	30.67 $\pm$ 0.49	13.57 $\pm$ 0.12	5.96 $\pm$ 0.35
6	 <b>105</b>	5.96 $\pm$ 0.55	8.15 $\pm$ 0.10	5.96 $\pm$ 0.55
7	 <b>106</b>	48.99 $\pm$ 0.72	12.22 $\pm$ 1.78	48.82 $\pm$ 2.79
8	 <b>107</b>	70.07 $\pm$ 1.57	45.31 $\pm$ 1.81	39.71 $\pm$ 0.28
9	 <b>108</b>	3.87 $\pm$ 0.98	11.75 $\pm$ 0.15	10.34 $\pm$ 0.74

10	 <b>109</b>	$74.33 \pm 2.54$	$40.79 \pm 3.01$	$34.58 \pm 1.20$
11	 <b>110</b>	$3.54 \pm 0.19$	$8.41 \pm 0.30$	$2.38 \pm 0.39$

In this group of compounds, the antiproliferative effect was induced by compounds **16**, **103**, **104**, **105**, **106**, **108** and **110** with  $IC_{50}$  value  $< 13.96 \mu\text{g/mL}$  in one (**16**, **102** and **106**) in two (**103**, **104**) or in the three cell lines (**105**, **108** and **110**). Considering the three cell lines, the most active compound was the hydroxyaldehyde **110** with  $IC_{50}$  value  $2.38 \pm 0.39, \mu\text{g/mL}$  in B16F10 line versus  $3.87 \pm 0.98$  in HT29 cells and  $5.96 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$  in both B16F10 and HT29 cell lines, for the lactol **108** and the hydroxyester **105** respectively.

The hydroxyaldehyde **110** showed also a strong antiproliferative effect on HepG2 and HT29 cells with  $IC_{50}$  values  $8.41 \pm 0.30$  and  $3.54 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$  respectively while the lactol **108** and the hydroxyester **105** exhibited an important cytotoxicity against HepG2 and B16F10 cells with  $IC_{50}$  values ( $11.75 \pm 0.15$   $10 \mu\text{g/mL}$ ,  $10.34 \pm 0.74 \mu\text{g/mL}$ ) and ( $8.15 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ ,  $5.96 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$ ) respectively.

For the rest of compounds, the mono-hydroxyester **104** exhibited a quite high activity but only against two cell lines; HepG2 and B16F10 with  $IC_{50}$  values  $13.57 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$  and  $5.96 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$  respectively. The dienone **103**, displayed a cytotoxic activity against HT29 ( $IC_{50}=11.89 \pm 0.80 \mu\text{g/mL}$ ) and B16F10 ( $IC_{50}=6.01 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ ). However the furan **16**, the diene **102** and the diol **106** showed moderate antiproliferative potential on only one cell line;  $IC_{50}$  values are respectively:  $13.96 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$  in HepG2 cells,  $13.01 \pm 1.80 \mu\text{g/mL}$  in B16F10 and  $12.22 \pm 1.78 \mu\text{g/mL}$  in HepG2 cells

As we can see, in the case of hydroxyesters **104** and **105**, the  $IC_{50}$  value was reduced at least by 40 % in HepG2 cells, when the **C-14** substitution is an ester group: **105**, instead of a methyl group: **104**. In addition, the continuous deduction was disclosed when the **C-14** ester substitution enhanced the antiproliferative effect against HT29 cells (hydroxyester **105**) approximately the 5-fold increase compared to that of the methyl group substitution at **C-14** (hydroxyester **104**), finally there is no changes between **104** and **105** cytotoxic activities against the skin melanoma cells B16F10. (Entries 5 and 6).

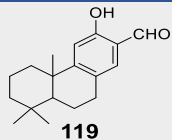
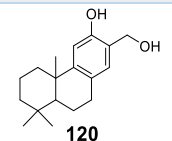
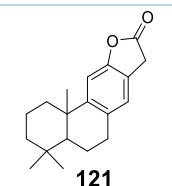
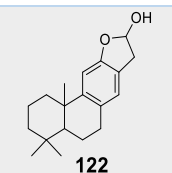
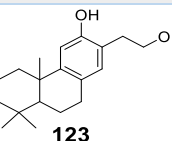
To reveal the role of **C-13** substitution in the antiproliferative effect of the tricyclic cassane diterpenoids, we compared the IC<sub>50</sub> values of the hydroxyaldehyde **110**, hydroxyester **104** and the hydroxy phenol **106**, as we can observe the cytotoxic activities decreased in all the tested cell lines, when **C-13** position is substituted with an ester group (hydroxyester **104**) in comparison with an aldehyde C-13 substitution (hydroxyaldehyde **110**), this decrease can reach the 40 % in HepG2, 50% in B16F10 and even up to 10 times less in HT29. Significant decrease was also observed with the CH<sub>2</sub>OH group substitution at **C-13** (hydroxy phenol **106**), but more accentuated in comparison to the hydroxyester **104** cytotoxic effect. (Entries 5, 7 and 11).

Regarding the **whole tetracyclic framework with a fused lactone/lactol or furan ring** and its impact on the cytotoxic potential of cassane diterpenoids, we compared the obtained IC<sub>50</sub> values of the lactol **108**, lactone **107** and the furan **16**: the most active compound was lactol **81** as mentioned before, whereas the corresponding o-hydroxyethyl phenol **109** showed very weak activity in all cell lines (74.33 ± 2.54 µg/mL in HT29, 40.79 ± 3.01 µg/mL in HepG2 and 34.58 ± 1.20 in B16F10). The lactone **107** exhibited the lowest effect with IC<sub>50</sub> values 70.07 ± 1.57 µg/mL in HT29, 45.31 ± 1.81 µg/mL in HepG2 and 39.71 ± 0.28 µg/mL in B16F10, together with furan **5** with IC<sub>50</sub> = 20.66 ± 1.09 µg/mL in HT29 and 31.73 ± 1.10 µg/mL in B16F10, excepting the hepatocarcinoma cell line HepG2 in which the furan **16** displayed selective cytotoxic activity (IC<sub>50</sub> 13.96 ± 0.50 µg/mL). This furanoditerpene can serve as a marker chemically to differentiate *C. crista* from the synonymous *C. bonduc.*<sup>2</sup>, it should be emphasized that there is no data available about the biological activity of (5α)-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**), till date. (Entries 1, 8, 9 and 10).

The dienone **103** is a tricyclic cassane diterpene with a conjugated α,β-unsaturated carbonyl moiety, exerted an important cytotoxic potential against HT29 and B16F10 cells but moderate one against HepG2, as mentioned before in this context. (Entry 4)

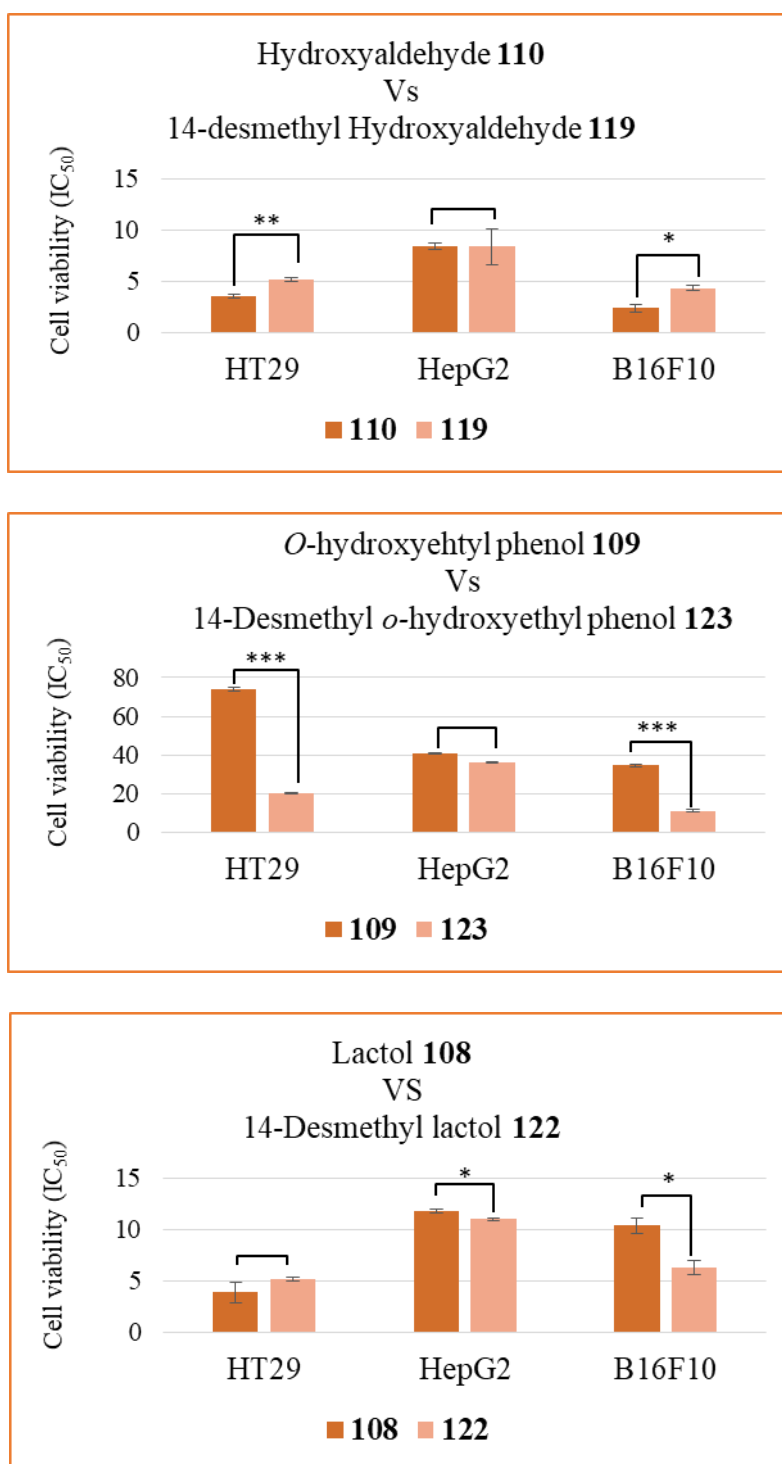
## 1.1.3. Cytotoxicity of group III compounds:

**Table 14:** Growth-inhibitory effects of **group III** compounds on the three cancer cell lines

ENTRY	PRODUCT	IC <sub>50</sub> µg/mL		
		HT29	Hep-Ge2	B16-F10
1	 <b>119</b>	5.19 ± 0.17	8.36 ± 1.77	4.33 ± 0.27
2	 <b>120</b>	17.43 ± 1.97	24.22 ± 2.71	10.51 ± 0.01
3	 <b>121</b>	74.26 ± 2.19	77.97 ± 0.72	74.26 ± 2.19
4	 <b>122</b>	5.14 ± 0.21	11.01 ± 0.12	6.28 ± 0.74
5	 <b>123</b>	20.01 ± 5.26	36.02 ± 0.51	10.97 ± 0.93

The obtained IC<sub>50</sub> data of five 14-desmethyl cassane analogues were in the range 4.33 - 77.97 µg/mL. In order to continue divulging the role that plays the C-14 cassane methyl group in the antiproliferative effect, we compared the IC<sub>50</sub> values of hydroxyaldehyde **110** and lactol **108** (group II) with their 14-Desmethyl analogues **119** and **122** (group III) respectively. (Entries 10, 11 table 13 and 1, 4 table 14)

As we can speculate, in the case of the hydroxyaldehyde **110** and its 14-desmethyl analogue **119**, the presence of C-14 cassane methyl group is rather important (moderate importance) for the cytotoxic effect only against the human colon adenocarcinoma cells ( $p \leq 0.01$  (\*\*)), while it doesn't much matter for the cytotoxic activity against human hepatocarcinoma and the murine melanoma cell line ( $p < 0.05$  (\*)).



**Figure 27.** The C-14 cassane methyl group impact on the cancer cell viability: Comparison between IC<sub>50</sub> values of compounds **108**, **109** and **110** versus their 14-desmethyl analogues **122**, **123** and **119** respectively, in the three cancer cell lines. Values represent means  $\pm$  S.E.M of three experiments in duplicate. Key:  $p < 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*).

However the lack or the presence of this functional group in the desmethyl lactol **122**, appears to not be important for its antiproliferative potential against all cell line ( $p < 0.05$  (\*)). (Fig. 27)

On the other hand it should be quoted that comparison between  $IC_{50}$  values of *o*-hydroxyethyl phenol **109** and its 14-desmethyl analogue **123**, lead us to conclude that the presence of C-14 methyl group reduced the antiproliferative activities especially against the murine melanoma B16F10 cells in 3-fold activity decrease ( $34.58 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$  for *o*-hydroxyethyl phenol **109** Versus  $10.97 \pm 0.93 \mu\text{g/mL}$  for its 14-desmethyl analogue **123**). The deficiency of  $\text{CH}_3$  at C14 position also enhanced the cytotoxic potential of 14-desmethyl hydroxyethyl phenol **123** in the human colon cancer cells HT-29, approximatively in 4-fold increase in cytotoxic activity compared to that of the diterpenic cassane **109** ( $IC_{50}$  from  $74.33 \mu\text{g/mL}$  to  $20.01 \mu\text{g/mL}$ ), ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*)). (Fig. 27). Inversely the absence of the C14 methyl group in the hydroxyethyl phenol **123**, seems to not be very important for the cytotoxic effect against the hepatocarcinoma cells HepG2 ( $p < 0.05$  (\*))

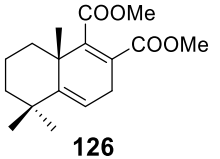
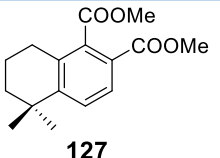
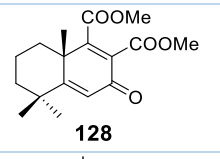
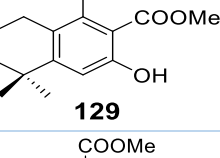
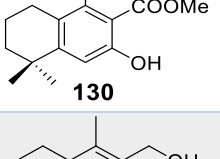
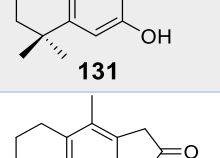
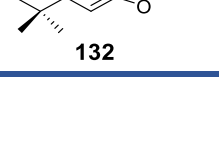
From this initial SAR data analysis, it could be deduced that methyl group at C-14 positions of cassane diterpenoids is relatively important for their cytotoxic effect even it can led to a significant drop of activity in some molecules of this family. (The salicylaldehyde **110** against HT29). Consequently, we cannot conjecture that the presence of the methyl group at C14 of the cassane framework is or not important for their general antiproliferative activity. In contrary, some previous researches<sup>131</sup> identified the C-14 functionality as critical for anticancer activity in this family of natural products.

---

<sup>131</sup> i ZY, Li QZ, Ma GX, Chen L, Zhang C, Chen BD, Yang JS, Li WP. Cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax* induce apoptosis in pituitary adenoma: structure–activity relationship, ER stress and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways. *Journal of Asian natural products research*. 2017 May 4;19(5):423-35.

## 1.1.4. Cytotoxicity of group IV compounds:

**Table 15:** Growth-inhibitory effects of **group IV** compounds on the three cancer cell lines

ENTRY	PRODUCT	IC <sub>50</sub> µg/mL		
		HT29	Hep-Ge2	B16-F10
1	 <b>126</b>	93.24 ± 1.86	69.97 ± 3.40	N/A
2	 <b>127</b>	30.38 ± 2.53	52.86 ± 0.07	45.26 ± 1.87
3	 <b>128</b>	100.25 ± 10.50	78.42 ± 1.07	69.89 ± 3.17
4	 <b>129</b>	92.94 ± 0.79	66.28 ± 0.07	53.24 ± 1.05
5	 <b>130</b>	32.15 ± 0.40	38.27 ± 0.67	43.40 ± 10.42
6	 <b>131</b>	2.45 ± 0.29	3.25 ± 0.33	3.84 ± 0.45
7	 <b>132</b>	19.20 ± 0.34	27.08 ± 1.39	27.08 ± 1.39

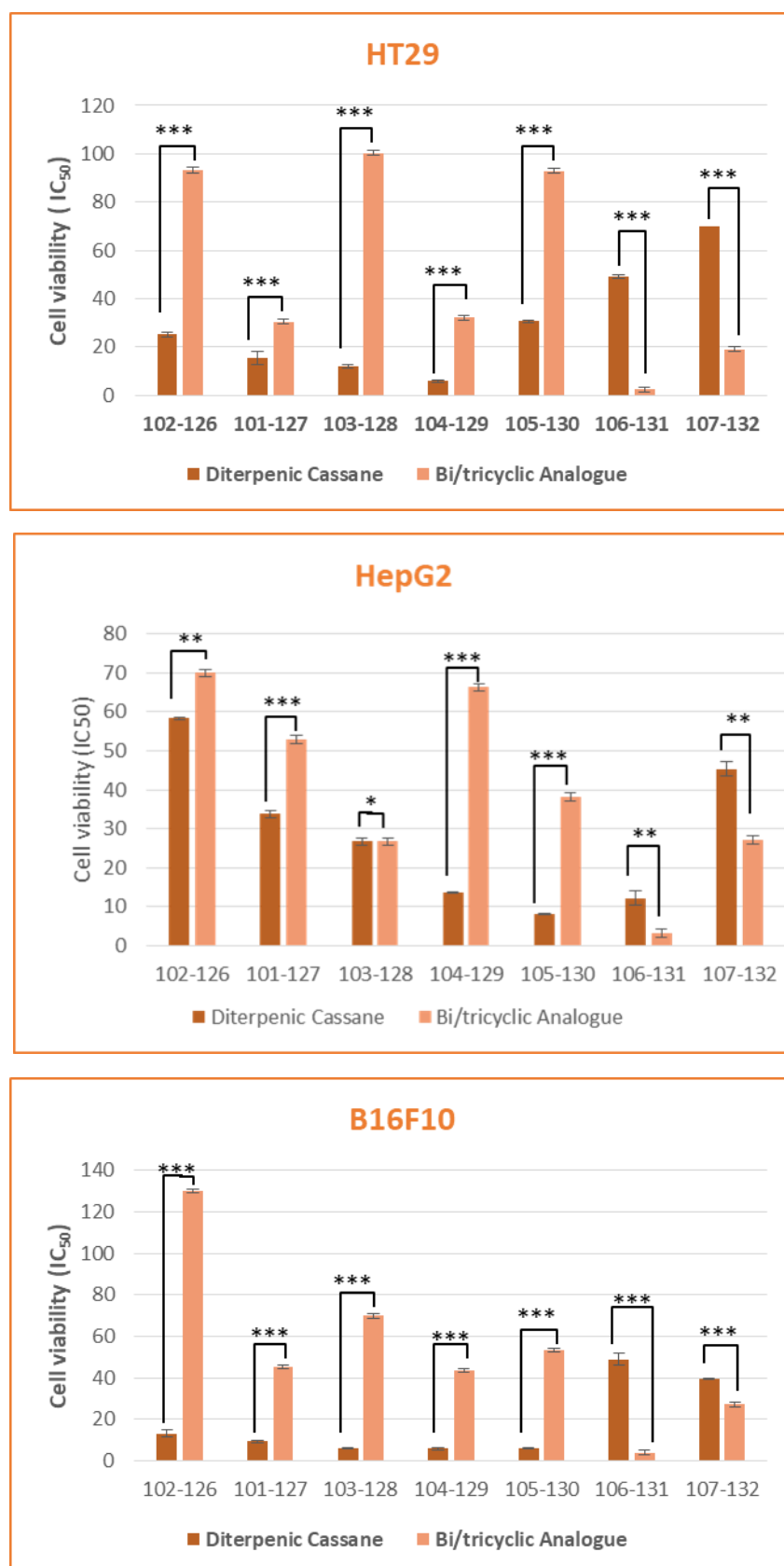
As shown in table 15 and Figure.28, the results of the *in-vitro* cytotoxic activities demonstrated that majority of bicyclic or tricyclic cassane analogues (**126-130**) showed significant reduction of cytotoxic activity ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*)): IC<sub>50</sub> data between 2.45 ± 0.29 µg/mL µg/mL and 100.25 ± 10.50 µg/mL, but still notably less potent than their correspondent cassane-type diterpenoids (**101-105**). Excluding the bicyclic analogue **131** and tricyclic analogue **132** which are more effective than their correspondent cassane diterpenoids **106** and **107**, as bi/tricyclic analogues **131** and **132** displayed more



significant and consistent effect, exhibited broad spectrum activity and greater percentage growth inhibition against all tested cancer cell lines: ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*))

IC<sub>50</sub> data:  $19.20 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ ,  $27.08 \pm 1.39 \mu\text{g/mL}$ ,  $27.08 \pm 1.39$  Vs  $70.07 \pm 1.57 \mu\text{g/mL}$ ,  $45.31 \pm 1.81 \mu\text{g/mL}$ ,  $39.71 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$  for compound **132** and **107**, in HT29, HepG2 and B16F10, respectively (Entries 7 table 17. and 8 table 15)

IC<sub>50</sub> data:  $2.45 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ ,  $3.25 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ ,  $3.84 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$  Vs  $48.99 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$ ,  $12.22 \pm 1.78 \mu\text{g/mL}$ ,  $48.82 \pm 2.79 \mu\text{g/mL}$  for compound **131** and **106**, in HT29, HepG2 and B16F10, respectively (Entries 6 table 17 and 7 table 15), the bicyclic analogue **131** was found to be 24, 4 and 16 times more potent than the diterpenic cassane **106** against HT29, HepG2 and B16F10, respectively



**Figure 28.** The cassane diterpenoids molecular weight impact on the cancer cell viability: Comparison between IC<sub>50</sub> values of compounds (101-107) and there bicyclic or tricyclic analogues (126-132), in the three cancer cell lines. Values represent means  $\pm$  S.E.M of three experiments in duplicate. Key:  $p < 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*).

Based on the previous results and combining them with the molecular weight data from the table 17, we can deduce that decreasing the cassane diterpenes size inferred by molecular weight mostly did not improve significantly the activity, and the hydrophobic part of the cassane skeleton, is not the responsible framework for the antiproliferative activities of cassane type diterpenoids.

Nevertheless, the two bicyclic and tricyclic cassane analogues **131** and **132** with the lowest molecular weight (220 g/mol, 230 g/mol respectively) were the most active compounds of this group even actually more potent than its correspondent cassane diterpenes **106** and **107** (288.43 g/mol and 298.43 g/mol). Interestingly, the presence of hydrophilic hydroxy group and the lower molecular weight of diol **131** may be the responsible features of its antiproliferative activity enhancement by facilitating its bioavailability and improving its drug likeness parameters (absorption ...)

**Table 17.** Data molecular weight (MW) of the five synthesized cassane bicyclic or tricyclic analogues.

<b>Cassane bicyclic or tricyclic analogue</b>	<b>126</b>	<b>127</b>	<b>128</b>	<b>129</b>	<b>130</b>	<b>131</b>	<b>132</b>
<b>Molecular weight (g/mol)</b>	292.17	276.14	306.15	248.14	292.13	220.15	230.13

In conclusion, all the above findings are consistent with previous studies of other molecules of naturally<sup>132</sup> occurred cassane diterpenoids, in other cancer cell types. Isolation of a series of cassane diterpenes from the seeds of *C. sappan.*, from *Caesalpinia minax.*<sup>133</sup> and some of them were demonstrated to possess potent cytotoxic effects against several cancer cell lines.

<sup>132</sup> Jing W, Zhang X, Zhou H, Wang Y, Yang M, Long L, Gao H. Naturally occurring cassane diterpenoids (CAs) of *Caesalpinia*: A systematic review of its biosynthesis, chemistry and pharmacology. *Fitoterapia*. 2019 Apr 1;134:226-49.

<sup>133</sup> Senwar KR, Sharma P, Reddy TS, Jeengar MK, Nayak VL, Naidu VG, Kamal A, Shankaraiah N. Spirooxindole-derived morpholine-fused-1, 2, 3-triazoles: Design, synthesis, cytotoxicity and apoptosis inducing studies. *European journal of medicinal chemistry*. 2015 Sep 18;102:413-24.

Accordingly, based on our preliminary screening test, we decide to investigate deeply the antitumor activity of two selected products from the group I: the hydroxyaldehyde **97** and the dienone **91**, in B16F10 melanoma cell line (which showed the highest cytotoxic effects in the range of concentrations assayed: IC<sub>50</sub> values  $2.55 \pm 1.29$  and  $7.63 \pm 0.42$   $\mu\text{g/mL}$ , in B16F10 melanoma cell line) and logically to discard the compounds **15**, **94** and **98** for the following cytometric studies realized: cell-cycle analysis. Characterization of apoptosis and changes in cell mitochondrial membrane potential.

## 1.2. Cell cycle Arrest and Distribution

Taking into account the cell-growth inhibition caused by the compounds **91** and **97**, their effects on cell-cycle distribution were further investigated using flow cytometry, to determine a possible cytostatic effect attached to the cytotoxic response and also to measure DNA ploidy as well as alterations in cell cycle profiles, since that the blockage of cell cycle progression by compounds is very interesting area for study.<sup>134</sup>

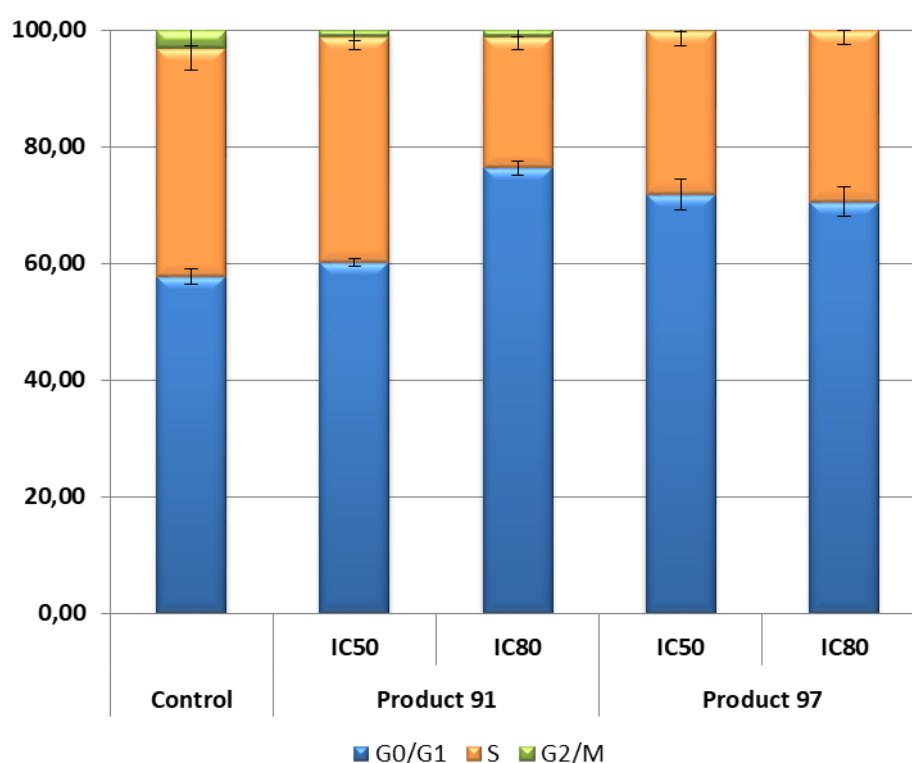
The DNA content was proportional to the PI fluorescence, allowing us to determine the percentage of cells in each cell-cycle phase, and also to visualize the cell subpopulations with different DNA content. Changes in DNA concentrations are characteristic of apoptosis and the cell-cycle arrest that can be related with the induction of the cell differentiation process. The distribution of cells in different cell-cycle phases was analyzed for 72 h of treatment, by the incorporation of propidium iodide (PI). B16-F10 melanoma cells were treated with the products at IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations:

**Table 18.** IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentration of products 91 and 97 in melanoma cells B16F10

Compound	B16F10	
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC <sub>80</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>91</b>	$7.63 \pm 0.42$	$12.31 \pm 1.62$
<b>97</b>	$2.55 \pm 1.29$	$6.65 \pm 2.55$

<sup>134</sup> a) Reyes FJ, Centelles JJ, Lupiáñez JA, Cascante M. (2 $\alpha$ , 3 $\beta$ )-2, 3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS letters*. 2006 Nov 27;580(27):6302-10. b) Garcia-Granados Andres. LDH. Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling byproducts. *PCT Int Appl*. 1998;(19):17 pp.-17 pp.

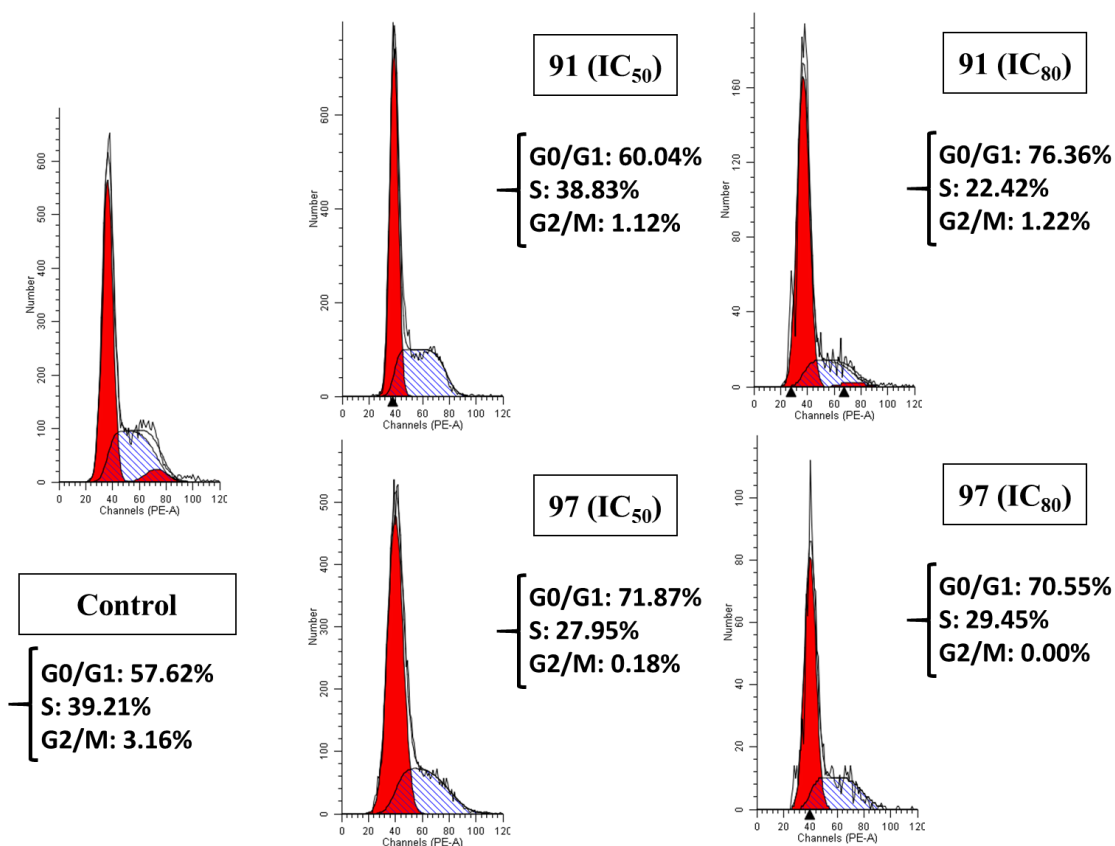
Analysis of the results given in the (Fig. 29 a-b) indicated that the two products **91** and **97**, produced a significant cell-cycle arrest, increasing the number of cells in the G0/G1 phase. The dienone **91** produced a highest effect increasing this population up to 76.36% at IC<sub>80</sub> concentration, being an increase of 18.24% with respect to the untreated control cells. Nevertheless this product did not displayed significant effect at IC<sub>50</sub> concentration, probably due to apoptotic and cytotoxic effects showed by this product. Whereas hydroxyaldehyde **97**, induced the cell cycle arrest in G0/G1 phase at both IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations, with values of 71.87% and 70.55% respectively, these represent an increase of 13.75% and 12.43% with respect to the untreated control cells respectively.



**Figure 29-a.** Increase of the percentage of cells in each cell-cycle phase with respect to untreated control cells. Cell-cycle was conducted after propidium iodide (PI) staining as it is described in Experimental section, G0/G1 phase (blue bars), S phase (orange bars), and G2/M phase (green bars). Values represent means  $\pm$  S.E.M of at least three independent experiments performed in duplicate.

These increases were accompanied by a concomitant decrease of the percentage of cells in S phase, with a percentage of the 22.42% at IC<sub>80</sub> concentration for the product **91**, this being a decrease of the 16,79% with respect to untreated control cells. And with values

of the 27.95% and 29.45% for IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations of the product **97**, these being a decreases of the 11.26% and 9.76% with respect to untreated control cells, respectively. Also, lower changes were observed in G2/M cell cycle phase.



**Figure 29-b:** Histograms of cell-cycle of B16-F10 skin-melanoma cells, after 72 h treatment with compounds **91** and **97**, at IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations.

The identification of new cytotoxic agents that enhance or restore the capability of malignant tumor cells to undergo apoptosis may be crucial for more effective anticancer therapies<sup>135</sup>. Otherwise, many cytotoxic compounds exert an inhibitory effect on growth by arresting the cell cycle at a particular checkpoint of the cell cycle<sup>136</sup>, by the induction of apoptosis<sup>137</sup> or by a combined effect on cell cycle and apoptosis<sup>138</sup>. In consequence,

<sup>135</sup> Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:29–40.

<sup>136</sup> Karunagaran D, Rashmi R, Kumar T. Induction of Apoptosis by Curcumin and Its Implications for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5(2):117–29.

<sup>137</sup> Tegeder I, Grösch S, Schmidtko A, Häussler A, Schmidt H, Niederberger E, Scholich K, Geisslinger G. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer research.* 2003 Apr 15;63(8):1846–52.

<sup>138</sup> Komlodi-Pasztor E, Sackett DL, Fojo AT. Inhibitors targeting mitosis: Tales of how great drugs against a promising target were brought down by a flawed rationale. *Clin Cancer Res.* 2012;18(1):51–63.

the cell cycle arrest showed by the dienone **91** and the hydroxyaldehyde **97** may reflect the induction of some of these process in the B16-F10 cells. Future additional analysis will be necessary to asseverate these points.

### 1.3.Characterization of apoptotic effects by flow cytometry with annexin-V

The cell cycle is an important chemotherapeutic target. However, inhibiting the cell cycle may not be sufficient to cause antitumor effects <sup>139</sup> . For that reason, we carried out a global evaluation of the effects of compounds **91** and **97** on apoptosis.

Apoptosis or programmed cell death is a physiological process that occurs in cells, by which cells are removed from tissues in a controlled manner. These cells biochemical events lead to characteristic morphological changes including chromatin condensation, nuclear fragmentation, cell shrinkage, dissociation of cell organelles, and disruption of the cell plasma membrane.<sup>140</sup>

In the current experiment, B16-F10 cells were treated with the compounds **91** and **97**, at the IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations for 24, 48 and 72h. The determination of apoptotic cells percentage were conducted through double staining with annexin V (An-V), conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC), and propidium iodide (PI). Cytometric FACS analysis using Annexin V-FITC staining and PI accumulation was used to differentiate four cell populations: Normal cells were negative for both PI and Annexin V-FITC (Annexin-V- and PI-), early apoptotic cells were positive for Annexin V-FITC and negative for PI (Annexin-V+ and PI-), whereas late apoptotic dead cells displayed strong Annexin VFITC and PI labeling (Annexin-V+ and PI+). Non-viable cells, which underwent necrosis, were positive for PI and negative for Annexin V-FITC (Annexin-V- and PI+).<sup>141</sup>

---

<sup>139</sup> a) Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites and Vectors*. 2011;4(1):2–9. b) Atlung T, Hansen FG. Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2002;184(7):1843–50.

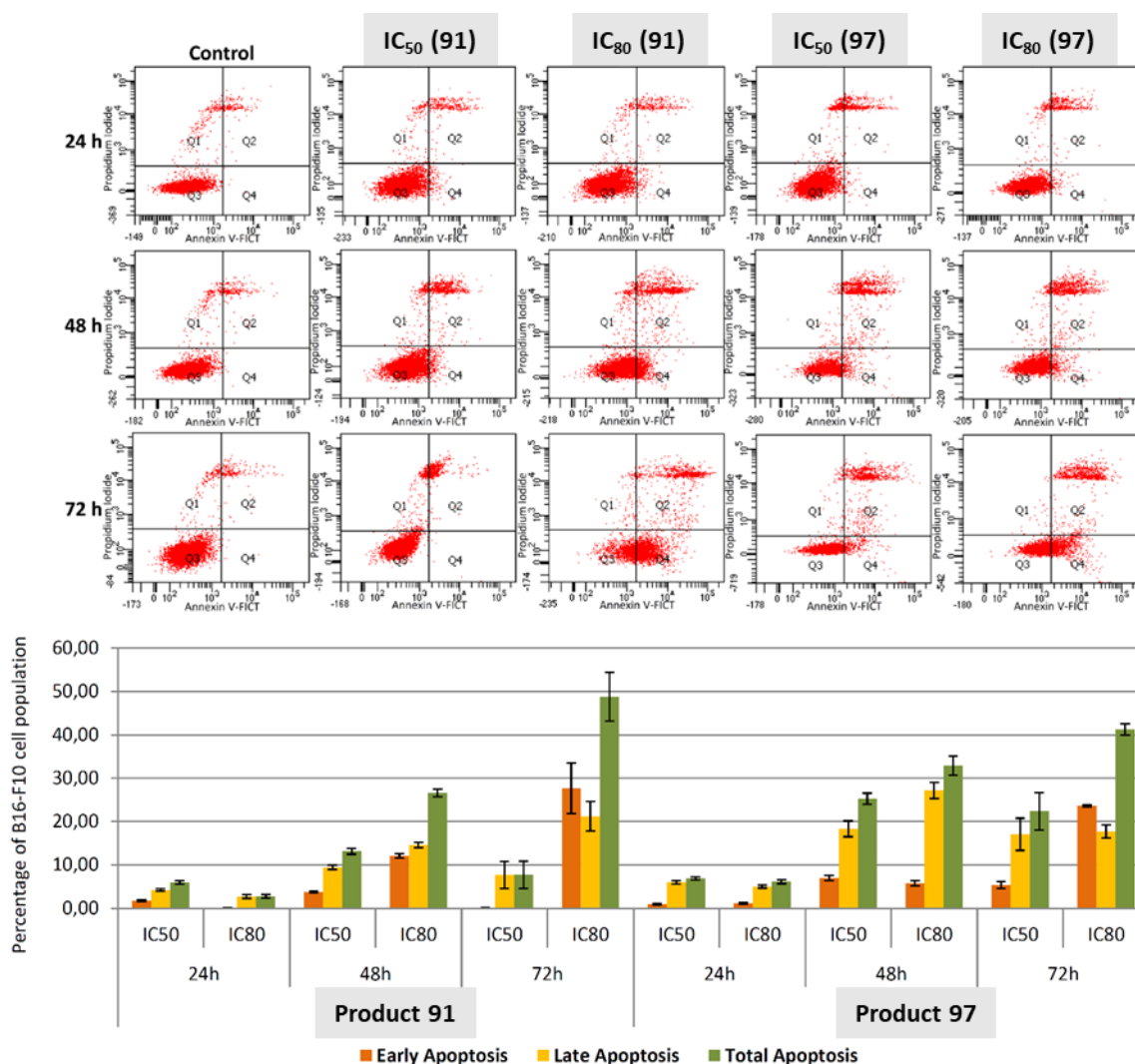
<sup>140</sup> Wilmink GJ, Ibey BL, Roth CL, Vincelette RL, Rivest BD, Horn CB, et al. Determination of death thresholds and identification of terahertz (THz)-specific gene expression signatures. *Opt Interact with Tissues Cells XXI*. 2010;7562:75620K.

<sup>141</sup> Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties Ronald K. Emaus, Ron Grunwald and John J. Lemasters . *Biochim Biophys Acta*. 1986;850:436–48.

The compounds **91** and **97** showed apoptotic effects on the treated cells, with high percentage of total apoptosis (early apoptotic together with late apoptotic cells). After 24h of treatment, the compounds **91** and **97** did not display a significant effect on apoptosis induction at initial times of treatment. Nevertheless, after 48h of treatment, the population of normal cells were reduced from 94.70% in untreated control cells to 70.60% and 64.93%, respectively, at IC<sub>80</sub> concentrations, and to 84.10% and 71.97%, at IC<sub>50</sub> concentrations (data not shown). At IC<sub>80</sub> concentrations the percentage of apoptosis reached at this time was 24.1% (11.97% early apoptosis and 11.87% late apoptosis) in response to compound **91**, and 30.1% (5.36% early apoptosis and 24.74% late apoptosis) for compound **97**. At IC<sub>50</sub> concentrations these percentages were 10.37% (3.63% early and 6.73% late apoptosis) for the compound **91** and 22.47% (6.83% early apoptosis and 15.63% late apoptosis) for the compound **97**.

The highest percentage of apoptosis was observed after 72h of treatment with these compounds, **91** and **97**, at IC<sub>80</sub> concentrations. At this time the percentage of cells in normal population decrease from 94.70% in untreated control cells to 47.47% and 57.9%, respectively, at IC<sub>80</sub> concentrations, and to 85.3% and 75.9% at IC<sub>50</sub> concentrations (data not shown). At IC<sub>80</sub> concentrations the percentage of total apoptosis reached was 46% (27.53% early apoptosis and 18.47% late apoptosis) in response to compound **91**, and 38.4% (23.47% early apoptosis and 15% late apoptosis for compound **97**. At IC<sub>50</sub> concentration these percentages were 4.93% (0% early and 4.93% late apoptosis) for the compound **91**, (it is possible that the high cytotoxicity of this compound, caused the disappearance of this cell population at this time), 19.6% (5.23% early apoptosis and 14.73% late apoptosis) for the compound **97**. In addition, the percentages of the necrotic population were not noteworthy, throughout the different conditions and times used in this experiment.





**Figure 30.** Effects of compounds **91** and **97** on apoptosis in B16-F10 skin-melanoma cells, after 24, 48 and 72 h treatment, at IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations. Top: Diagrams of annexin V/propidium iodide (IP) flow cytometry. B16-F10 cells were labeled with annexin V-FICT/PI as described in Experimental section. The right quadrants of each diagram represent apoptotic cells (Q2, late apoptosis; Q4, early apoptosis). Early apoptotic cells were annexin V+ PI-, whereas late apoptotic cells were annexin V+, PI+. Bottom: Flow cytometry analysis of Annexin V-FITC staining and PI accumulation, values represent means  $\pm$  S.E.M of three experiments in duplicate. Key:  $p < 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*), and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*), respect to untreated control cells.

The obtained results showed an increase of the apoptotic population cells in a concentration dependent manner, being highest at IC<sub>80</sub> concentrations that at IC<sub>50</sub> concentrations for both compounds. In general terms late apoptosis population cells was higher than the initial apoptosis, except to IC<sub>80</sub> concentrations after 72h of treatment, conditions in which the highest percentages of apoptosis were obtained.

The low value of total apoptosis observed for the compound **91** after 72h of treatment, can be explained by its high cytotoxicity, caused the disappearance of this cell population at this time (future assays will be necessary to asseverate this point)

The good percentages of apoptosis attained by these derivatives, indicate that they exerts its cytotoxicity action by apoptosis induction and could be used as promising anticancer drugs. The identification of new cytotoxic agents that enhance or restore the capability of malignant tumor cells to undergo apoptosis may be crucial for more effective anticancer therapies.<sup>133</sup>

#### 1.4. Mitochondrial membrane potential disturbances

In a first approximation to molecular mechanism, we analyzed the mitochondrial-membrane potential (MMP). Loss of mitochondrial membrane potential (MMP) during apoptotic process of apoptosis has been associated with an intrinsic apoptosis activation, while inducing apoptosis without MMP changes may suggest activation of the extrinsic apoptotic pathway.

We investigated the MMP to determine the possible mechanism involved in the apoptotic responses, in B16-F10 cell line, of the compounds **91** and **97**, at the same time and concentration of the cytotoxic and apoptotic responses. The changes in MMP were analyzed by monitoring the cell fluorescence following double staining with Rh123 and PI. Rh123 is a membrane permeable fluorescent cationic dye that is selectively taken up by mitochondria directly proportional to MMP.<sup>142</sup>

Changes in MMP were analyzed by flow-cytometry staining with Rh123/IP after treatment with the compounds **91** and **97** for 72 h, at IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations.

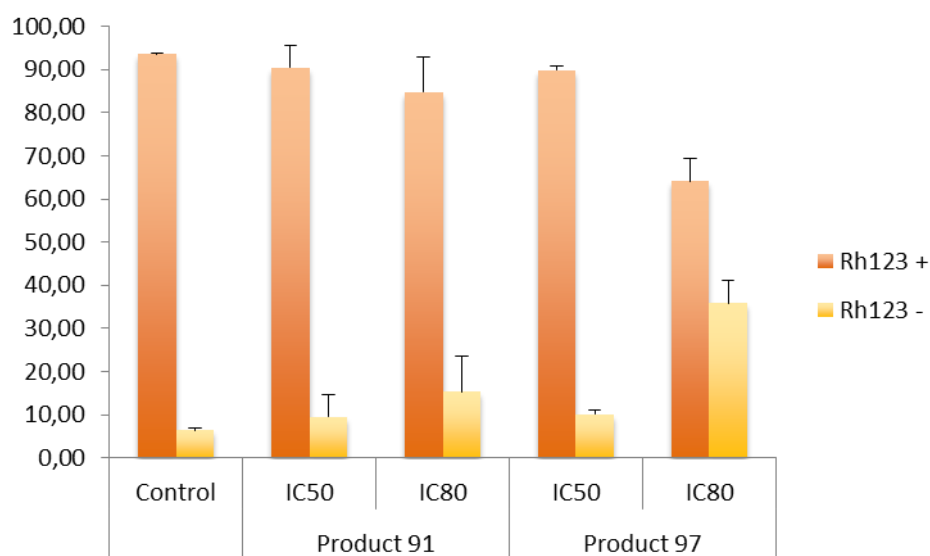
The treatment with dienone **91** did not produce any changes of the MMP, which suggest the activation of the extrinsic apoptotic pathway, since at this time and concentrations this product is clearly apoptotic.

Similar results were obtained for the hydroxyaldehyde **97**, nevertheless at IC<sub>80</sub> concentration the population of cells Rh123 negative was higher that found in the control

---

<sup>142</sup> Dong R, Yuan J, Wu S, Huang J, Xu X, Wu Z, Gao H. Anti-inflammation furanoditerpenoids from *Caesalpinia minax* Hance. *Phytochemistry*. 2015;117:325–31.

untreated cells, probably due to the high cytotoxicity of the compound at this time and concentration.



**Figure 31.** Effects of compounds **91** and **97** on mitochondrial membrane potential in B16-F10 skin-melanoma cells, after 72 h treatment, at IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations: Percentage of Rh123 positive and negative B16-F10 cell population, in comparison with untreated control cells (CT).

Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M of three experiments in duplicate.

Also this loss of part of MMP can be related with the secondary activation of the intrinsic apoptotic pathway as final event in the extrinsic apoptosis mechanism. Further molecular studies will be necessary to confirm these asseverations. Fig. 31

In conclusion compound **91** and **97** exhibited important antitumor activities on all the studies tumor cell lines, especially on the skin-melanoma cancer cells B16F10, accordingly these compounds, might have the potential to be the candidates of novel chemotherapeutic agents.

## 2. Antiinflammatory activity

### 2.1. Cytotoxicity on RAW 264.7 cell line

**Table 19:** Growth-inhibitory effects of all tested compounds on RAW 264.7 monocyte/macrophage murine cells.

GROUP	PRODUCT	IC <sub>20</sub> µg/mL	IC <sub>50</sub> µg/mL	IC <sub>80</sub> µg/mL
GROUP I	<b>17</b>	38.12 ± 8.23	68.60 ± 1.41	87.15 ± 0.51
	<b>91</b>	10.37 ± 0.17	11.64 ± 1.24	11.40 ± 0.03
	<b>94</b>	9.58 ± 2.87	44.56 ± 2.45	85.18 ± 2.16
	<b>97</b>	5.87 ± 0.46	6.97 ± 0.33	8.35 ± 0.20
	<b>78</b>	30.59 ± 0.39	33.82 ± 0.18	37.93 ± 0.06
GROUP II	<b>16</b>	50.92 ± 1.61	57.55 ± 1.06	65.51 ± 0.95
	<b>101</b>	22.92 ± 0.13	24.67 ± 0.04	26.89 ± 0.02
	<b>102</b>	43.66 ± 2.37	64.62 ± 1.39	83.67 ± 0.64
	<b>103</b>	14.51 ± 0.68	26.72 ± 0.88	N/A
	<b>104</b>	7.32 ± 2.53	13.11 ± 1.51	20.38 ± 0.26
	<b>105</b>	4.95 ± 0.13	7.49 ± 0.86	11.78 ± 2.97
	<b>106</b>	70.83 ± 0.28	74.65 ± 0.17	78.94 ± 0.28
	<b>107</b>	34.92 ± 2.11	45.34 ± 1.33	64.21 ± 3.29
	<b>109</b>	40.13 ± 2.52	52.25 ± 2.57	70.02 ± 3.14
	<b>108</b>	7.86 ± 3.97	8.34 ± 2.51	9.35 ± 0.95
<b>110</b>	12.69 ± 0.30	14.99 ± 0.32	18.56 ± 0.45	
GROUP III	<b>119</b>	5.13 ± 0.18	5.87 ± 0.18	6.80 ± 0.24
	<b>120</b>	9.09 ± 0.03	13.94 ± 0.07	20.75 ± 0.48
	<b>121</b>	42.62 ± 0.74	53.92 ± 0.36	66.33 ± 0.35
	<b>122</b>	10.17 ± 0.63	14.03 ± 0.23	18.82 ± 0.43
	<b>123</b>	11.04 ± 0.27	14.46 ± 0.09	19.48 ± 0.17
GROUP IV	<b>126</b>	61.16 ± 1.67	81.10 ± 0.93	94.62 ± 0.55
	<b>127</b>	68.61 ± 0.57	69.86 ± 0.21	71.32 ± 0.33
	<b>128</b>	55.07 ± 3.03	71.67 ± 0.87	85.55 ± 0.43
	<b>129</b>	76.87 ± 2.77	90.14 ± 1.26	98.29 ± 0.43
	<b>130</b>	37.11 ± 0.62	47.56 ± 0.64	59.52 ± 1.63
	<b>131</b>	3.06 ± 0.25	3.98 ± 0.25	5.29 ± 0.27
	<b>131</b>	24.09 ± 1.97	35.24 ± 0.94	50.66 ± 0.26

Growth inhibitory effects of the newly-synthesized diterpenoids and their analogues were analyzed on RAW 264.7 monocyte/macrophage murine cells, establishing the values of their infra-cytotoxic concentrations. This is necessary to confirm the inhibitory activity

on inflammation process by the compounds, and not whether these effects are due to their intrinsic cytotoxic activity.

Cell viability was determined on RAW 264.7 murine macrophage cells by the well-established MTT assay. The results indicated that the compounds under study in the conditions assayed (from 0 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ), showed high to weak cytotoxic activity toward RAW 264.7 cells.

### **Group I:**

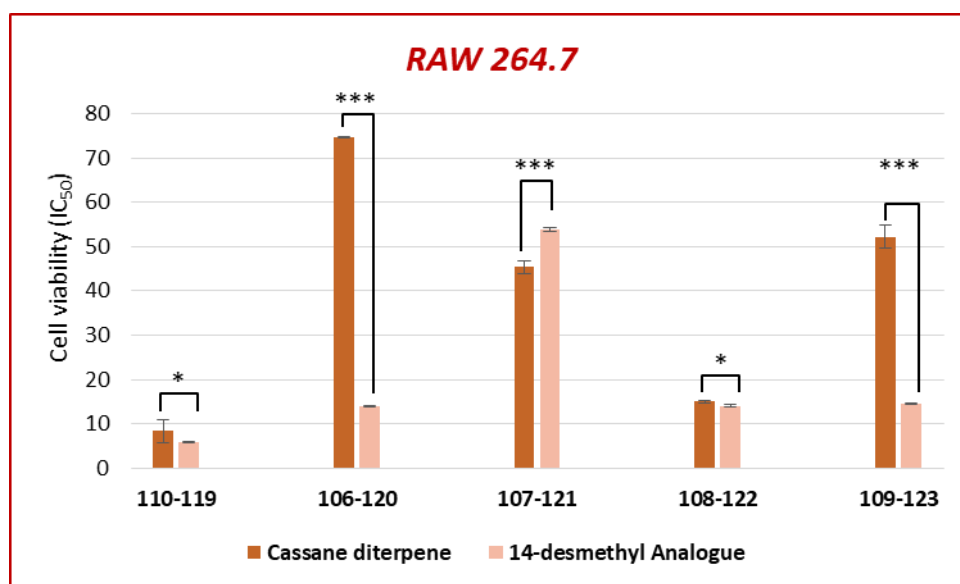
The hydroxyaldehyde, **97**, displayed the most potent effect with the lowest value of  $\text{IC}_{50}$  (concentration causing 50% reduction growth), 6.97  $\mu\text{g/mL}$ , followed by dienone, **91**, exerting a significant effect with  $\text{IC}_{50}$  value of 11.64  $\mu\text{g/mL}$  and the diol, **98**, with a moderate activity 33.82  $\mu\text{g/mL}$ , finally phenol, **94**, and taepeenin F (**17**) showed a moderate to weak cytotoxic effect with  $\text{IC}_{50}$  values of 44.56  $\mu\text{g/mL}$  and 68.60  $\mu\text{g/mL}$  respectively. Moreover, we have determined the compound concentrations required for 20% and 80% of growth inhibition ( $\text{IC}_{20}$  and  $\text{IC}_{80}$ ) to analyze the complete range of cytotoxicity, determining the acute or gradual response of RAW 264.7 cells to these compounds (Table 19).

### **Group II:**

In this group of compounds, the hydroxyester **105** is the most active with  $\text{IC}_{50}$  value 7.49  $\pm$  0.86  $\mu\text{g/mL}$ , followed by the hydroxyaldehyde **110**,  $\text{IC}_{50}$  8.34  $\pm$  2.51  $\mu\text{g/mL}$ , hydroxyester **104** with 13.11  $\pm$  1.51  $\mu\text{g/mL}$  and lactol **108**,  $\text{IC}_{50}$  value 14.99  $\pm$  0.32  $\mu\text{g/mL}$ . For the rest of compounds, the range of their broad-spectrum cytotoxic activities inferred by  $\text{IC}_{50}$  data was moderate to weak, between 24.67  $\pm$  0.04 and 74.65  $\pm$  0.17  $\mu\text{g/mL}$ . (Table 19)

### **Group III:**

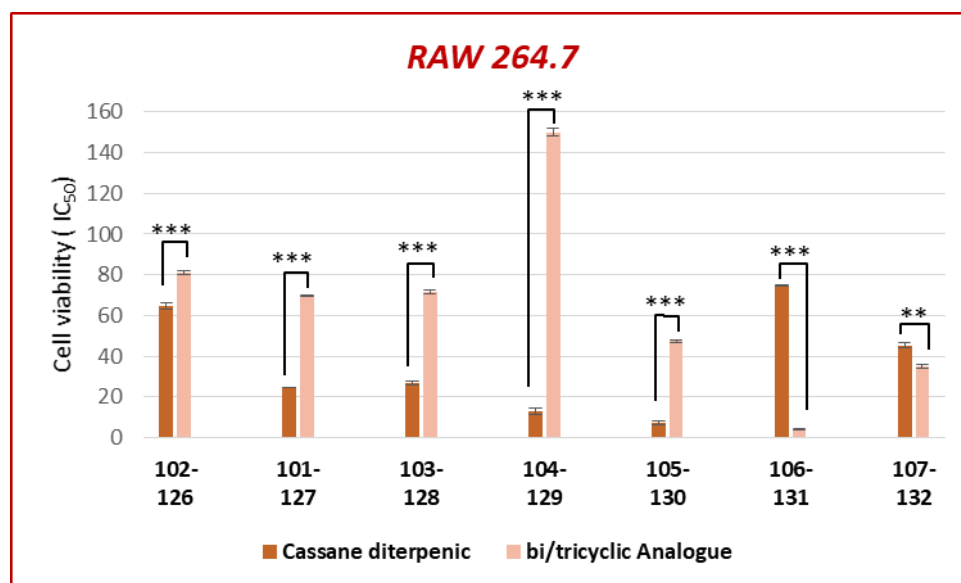
As aforementioned, this product category was synthesized to investigate the C14 methyl group impact of cassane diterpenoids on their cytotoxic activities, in view of this, herein we compare the  $\text{IC}_{50}$  values of these analogues and their correspondent diterpenic cassane.



**Figure 32.** The C-14 cassane methyl group impact on monocyte/ macrophage RAW 264.7 cell viability: Comparison between IC<sub>50</sub> values of compounds **106—110**, versus their 14-desmethyl analogues **119—123**, in the three cancer cell lines. Values represent means  $\pm$  S.E.M of three experiments in duplicate. Key:  $p < 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*).

From the figure 32, it can be clearly observed that in the case of cassane diterpenoids **108** and **110**, there is no significant difference ( $p < 0.05$  (\*)) between their antiproliferative potential and that of their 14-desmethyl analogues **122** and **119**. Accordingly we can conclude that the methyl group at **C14** position of these products is not very important for their cytotoxic effect, against RAW264.7 cells. Unlike the two diols **106** and **109** in which the presence of this functional group reduced strongly their antiproliferative effects (**106** and **109** are almost 6 and 4 times less active than their analogues **120** and **123** respectively) ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*))

However, IC<sub>50</sub> data of the lactone **107** and its desmethyl analogue **121**, indicated that the presence of CH<sub>3</sub> at C-14 improved the antiproliferative effect by at least 15%, and not the contrary. ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*))

**Group IV:**

**Figure 33.** The cassane diterpenoid molecular weight impact on monocyte/ macrophage RAW 264.7 cell viability: Comparison between IC<sub>50</sub> values of compounds (**110-107**) and their bicyclic or tricyclic analogues (**126-131**), in the three cancer cell lines. Values represent means  $\pm$  S.E.M of three experiments in duplicate. Key:  $p < 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)).

All bicyclic or tricyclic cassane analogues exhibited antiproliferative effect against monocyte/ macrophage RAW 264.7 cells with the mean IC<sub>50</sub>, from  $3.98 \pm 0.25$   $\mu\text{g/mL}$  to  $90.14 \pm 1.26$   $\mu\text{g/mL}$ ; the first five analogues (**126-130**) displayed a weaker effect than their correspondent diterpenic cassane (**101-105**), consequently, reducing molecular weight in these products would result in a complete loss of activity: this drop in activity is between 20% and 85% for all the five first analogues. ( $P \leq 0.001$  (\*\*\*)).

On the other hand the bicyclic or tricyclic analogues **131** and **132**, inversely were found to be more toxic against monocyte/ macrophage RAW 264.7 cells than their correspondent diterpenic cassane **106-107**, and showed much better activity, the improvement rate of **132** and **131** cytotoxic activity is about 95% and 22% respectively. ( $P \leq 0.001$  (\*\*\*)). (Fig. 33)

Therefore, taken into account the molecular weight data ( table 17), we can deduce that the size reduce of these diterpenic cassane **106**, **107** might be responsible for this cytotoxic behavior together with other chemical features such as the hydrophilic hydroxyl group of compound **131** and the lactone ring of compound **132**.

In summary, all the previous findings promotes us more to investigate the anti-inflammatory activities of –at least- products belonging to the first and the second group: ( final molecules and intermediates)

◆ Sub-cytotoxic concentrations corresponding to  $IC_{50}$ ,  $\frac{3}{4} IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} IC_{50}$ , and  $\frac{1}{4} IC_{50}$ , were used further in the next assays, for the deep determination of the anti-inflammatory response.

◆ The study of the NO release inhibition of all the sixteen products.

◆ Inasmuch as the best antiproliferative result in the 1<sup>st</sup> group, was observed for hydroxyaldehyde **97** and the dienone **91** against the monocyte/ macrophage RAW 264.7 cells ( $IC_{50}$  values  $6.97 \pm 0.33$  and  $11.64 \pm 1.24$   $\mu\text{g/mL}$ ) we analyzed the effect of **97** and **91** on the RAW 264.7 cell cycle

## 2.2. Inhibition of NO production

In the proinflammatory responses, a usually analyzed mediator is the nitric oxide (NO). NO, is released as intermediate or second messenger. The enzymatic production of NO is cell-type specific, with cytokine-driven inducible nitric-oxide synthase (iNOS) noted initially for the burst of higher levels as part of the inflammatory activation process. The induction of NO is a main indicator in the evaluation of the inflammatory activities, NO can be generated by activated macrophages and it is involved in some inflammatory disorders including rheumatoid arthritis, chronic hepatitis, and pulmonary fibrosis <sup>130</sup>

The anti-inflammatory activity can be measured by nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) quantification, which is stoichiometrically proportional to the concentration of NO released. These nitrites concentrations can be determined through the Griess reaction<sup>143</sup>

Lipopolysaccharide (LPS, a Gram-negative bacterium cell wall component) is a potent macrophage activator that inhibits macrophage proliferation (induce cell cycle arrest) and stimulates production of nitric oxide (NO) via NO synthase II (NOSII).

The LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell is frequently employed as a classical inflammatory cell model, since it can produce the highest release of NO during

---

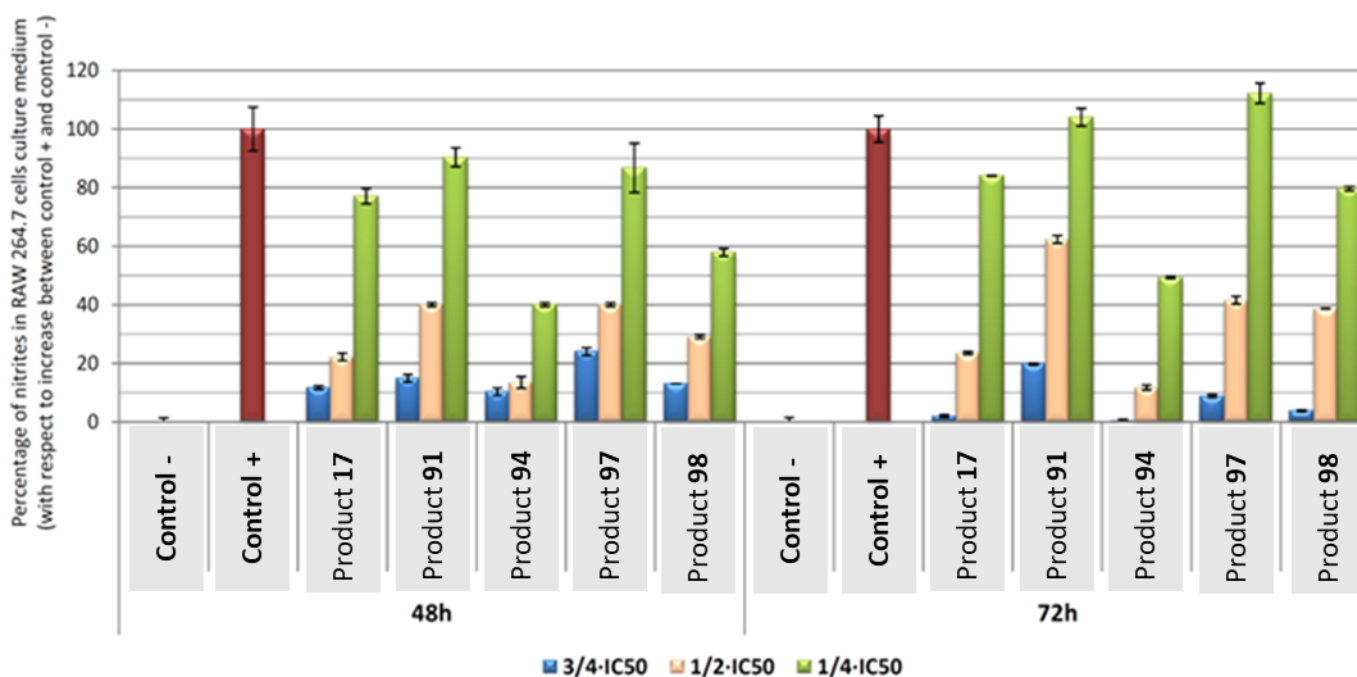
<sup>143</sup>Lu X, Min L, Wei J, Gou H, Bao Z, Wang J, Wang Z, Huang Y, An B. Heliangin inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation through signaling NF- $\kappa$ B pathway on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;88:102–8.



the inflammatory response. Herein, the tested compounds were assessed for their inhibitory activities against lipopolysaccharide (LPS)-activated NO production in RAW 264.7 cells. Firstly, macrophages were activated with LPS during 24h. Then the compounds of the first group (**17, 91, 94, 97** and **98**) and the compounds belonging to the second group (**16, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109** and **110**), were added to the cells which were incubated for 48h and 72h, after the activation period. Sub-cytotoxic concentrations corresponding to  $\frac{1}{4}IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}IC_{50}$  and  $\frac{3}{4}IC_{50}$  were used. Finally, the Griess reaction was used to determine the nitrites concentration in all samples.

### A) GROUP I

The results showed that all tested compounds exhibited very important inhibition of NO release (Fig. 34a), with degrees convergent of inhibition in the NO production.



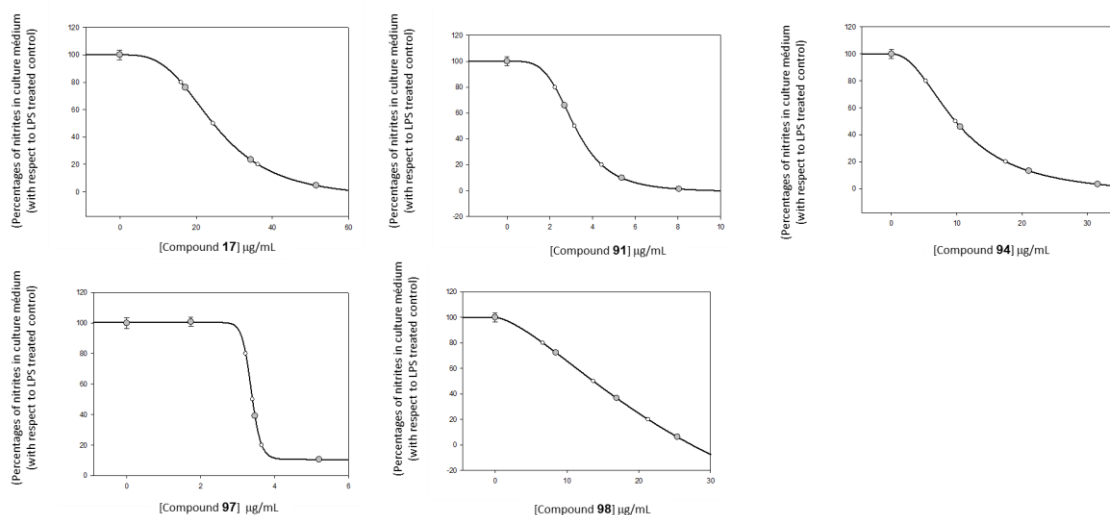
**Figure 34a.** Effect of compounds belonging to the **1<sup>st</sup> group** on the release of nitrites assay in LPS activated RAW 264.7 macrophage murine cells at  $\frac{1}{4}IC_{50}$  (blue bars),  $\frac{1}{2}IC_{50}$  (pink bars) and  $\frac{3}{4}IC_{50}$  (green bars) concentrations, after 48 and 72 h of treatment. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.

After 48 h of incubation, the higher anti-inflammatory effect was produced by the phenol, **94**, with 89.70% and 86.5% of inhibition of NO release at nontoxic concentrations  $\frac{3}{4}IC_{50}$  (8.05  $\mu\text{g/mL}$ ) and  $\frac{1}{2}IC_{50}$  (5.37  $\mu\text{g/mL}$ ) respectively, percentage calculate with respect to the increase between positive control (only LPS treated control cells) and negative control (untreated control cells). Moreover, diterpenoids **17**, **91** and **98** exerted also very strong inhibitory activity at  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentration, with a percentage of inhibition in NO production around 85% for these compounds (being 88.33%, 85.13% and 86.96%, respectively). At  $\frac{1}{2}IC_{50}$  the percentage of NO inhibition for these compounds were 77.80%, 59.95% and 70.94% respectively. At  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentration the lower anti-inflammatory effect was displayed by the hydroxyaldehyde, **97**, with a 76.49% of inhibition in NO production, although being a very important inhibitory rate.

After 72h, the inhibition was, in general terms, even more pronounced than after 48h of treatment. At this time, all compounds displayed strong inhibition of the inflammatory process, with percentage of inhibition of NO release between 80% and 99% at  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentrations. At  $\frac{1}{2}IC_{50}$  concentrations the results were similar to found after 48h of treatment. At all times assayed the lowest values of inhibition in NO were obtained at  $\frac{1}{4}IC_{50}$  concentrations.

The highest inhibition in the NO production was reached in the treatment with the compound **94**, inhibited by 99% the NO release (increasing a 10% with respect to the results found after 48h of treatment), displaying its strongest effect after 72h of treatment. Followed by compounds **17**, **98** and **97** with 98%, 96% and 91%, of depressed NO, respectively. The lowest inhibition rate were reached by the compound **97** after 48h of treatment (76%) and by the compound **91** after 72h of treatment (80%)

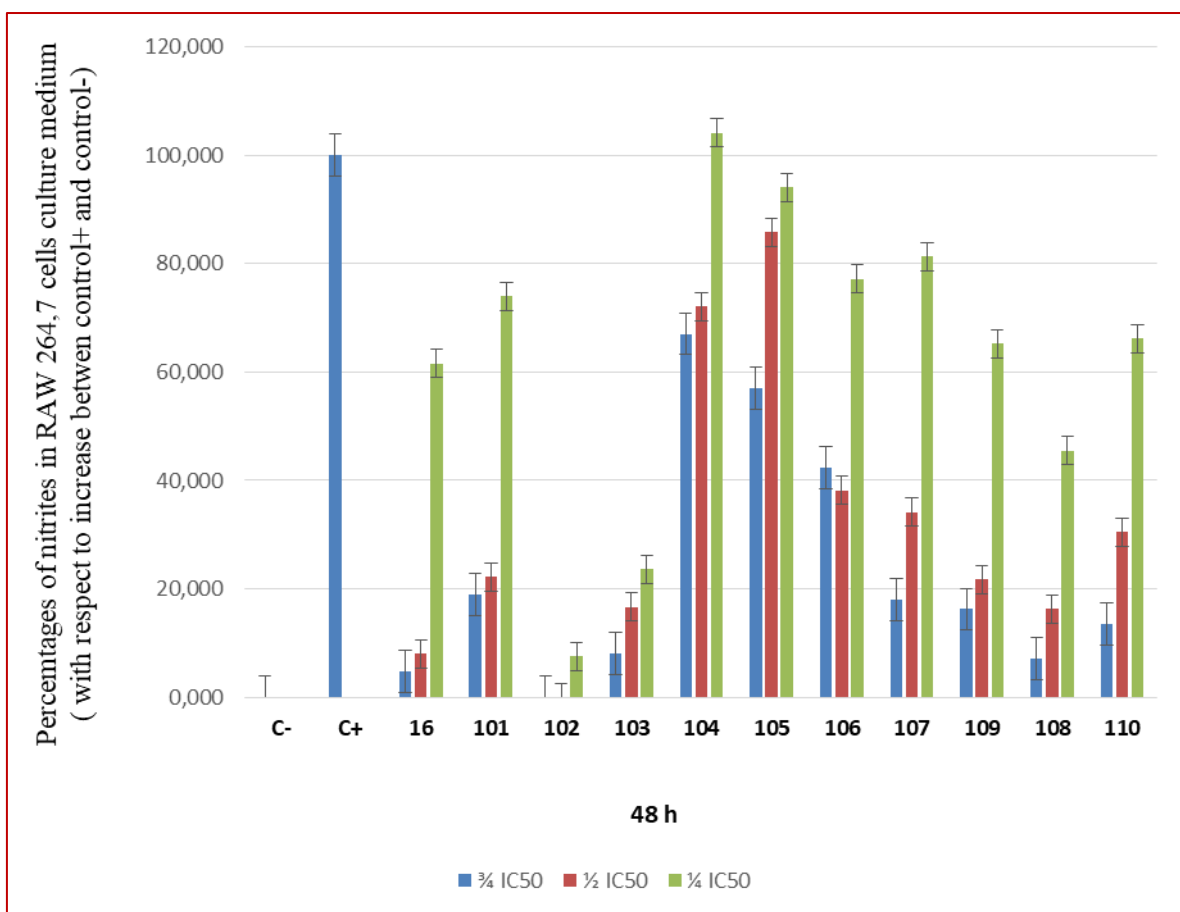
To complete the anti-inflammatory effect of **group I** compounds, we calculated the concentration to reduce by 50% the production of NO ( $IC_{50} \text{ NO}$ ) at the time assayed (Fig. 34b). The results showed that the strongest inhibitor of the NO production after 72h of treatment is the salicylaldehyde **97** with  $IC_{50} \text{ NO}$  value of  $3.39 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$ , followed by the dienone **91** with  $IC_{50} \text{ NO}$ ,  $5.38 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ . The  $IC_{50} \text{ NO}$  of compounds **94**, **98** and **17** were respectively:  $11.15 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ ,  $24.69 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$  and  $26.84 \pm 0.62 \mu\text{g/mL}$ .



**Figure 34b.** Sigmoidal curves of the effect of the **group I** products on the release of nitrites in RAW 264.7 macrophage murine cells, after 72 h of treatment. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.

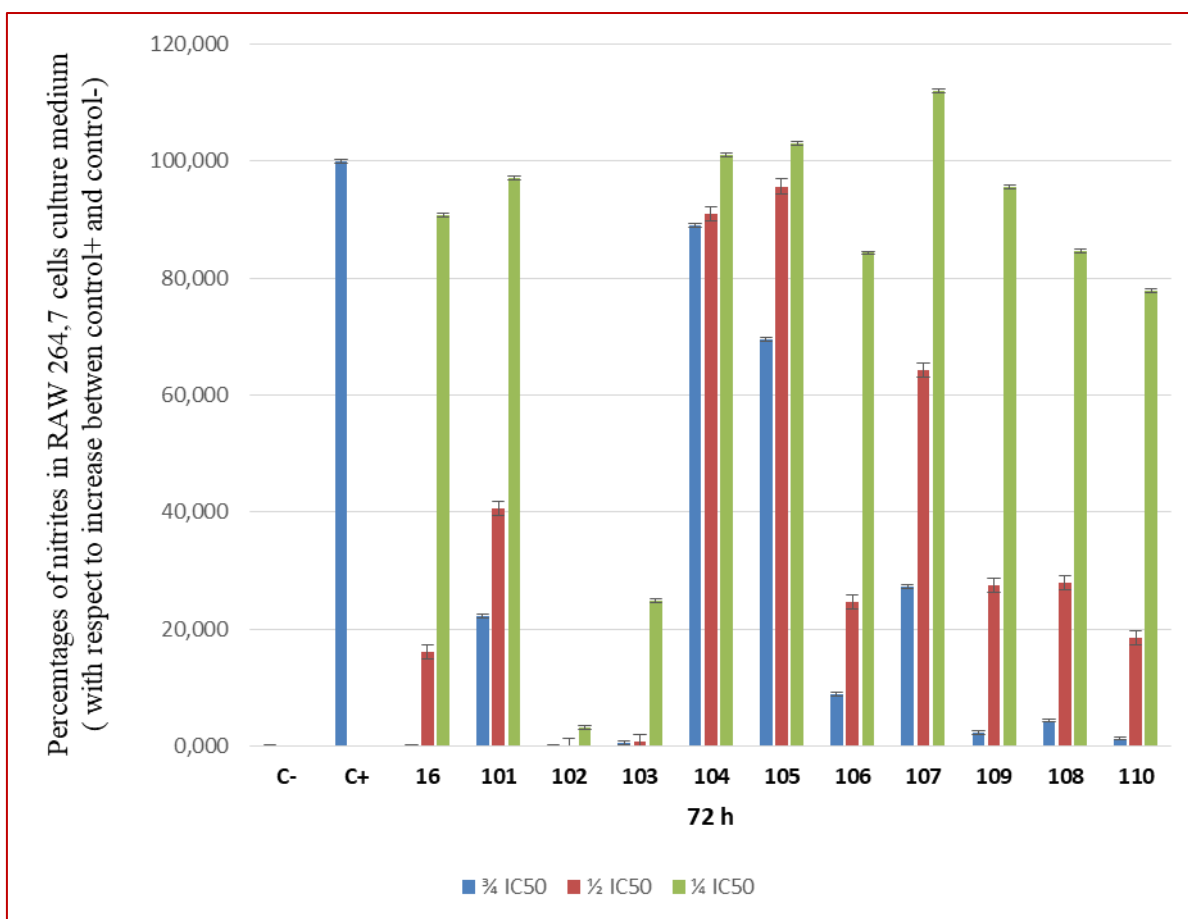
## B) GROUP II

The results showed that all tested compounds exhibited very important inhibition of NO release (Fig. 35). The inhibition percentages were calculated with respect to the increase between positive control (only LPS treated control cells) and negative control (untreated control cells).



**Figure 35a.** Effect of compounds belonging to the **2<sup>nd</sup> group** on the release of nitrites assay in LPS activated RAW 264.7 macrophage murine cells at  $\frac{1}{4}IC_{50}$  (green bars),  $\frac{1}{2}IC_{50}$  (brown bars) and  $\frac{3}{4}IC_{50}$  (blue bars) concentrations, after **48 h** of treatment. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate

After 48 h of incubation, the higher anti-inflammatory effect was produced by the product, **102**, with 100% of inhibition of NO release at noncytotoxic concentrations  $\frac{3}{4}IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}IC_{50}$  and 92.5% of inhibition of NO release at noncytotoxic concentrations  $\frac{1}{4} IC_{50}$  respectively, Also furan **16**, lactol **108** and dienone **103** showed very powerful inhibitory activity at  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentration, with a percentage of inhibition in NO production around 95% for these compounds (being 95.2%, 93% and 92%, respectively). At  $\frac{1}{2}IC_{50}$  the percentage of NO inhibition for these compounds were 92%, 83.76% and 83.37% respectively. At  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentration the lower anti-inflammatory effect was displayed by hydroxyesters, **104** and **105** with a 32.96% and 43.21% respectively, of inhibition in NO production, which represent a moderate inhibitory rate. (Fig.35a)

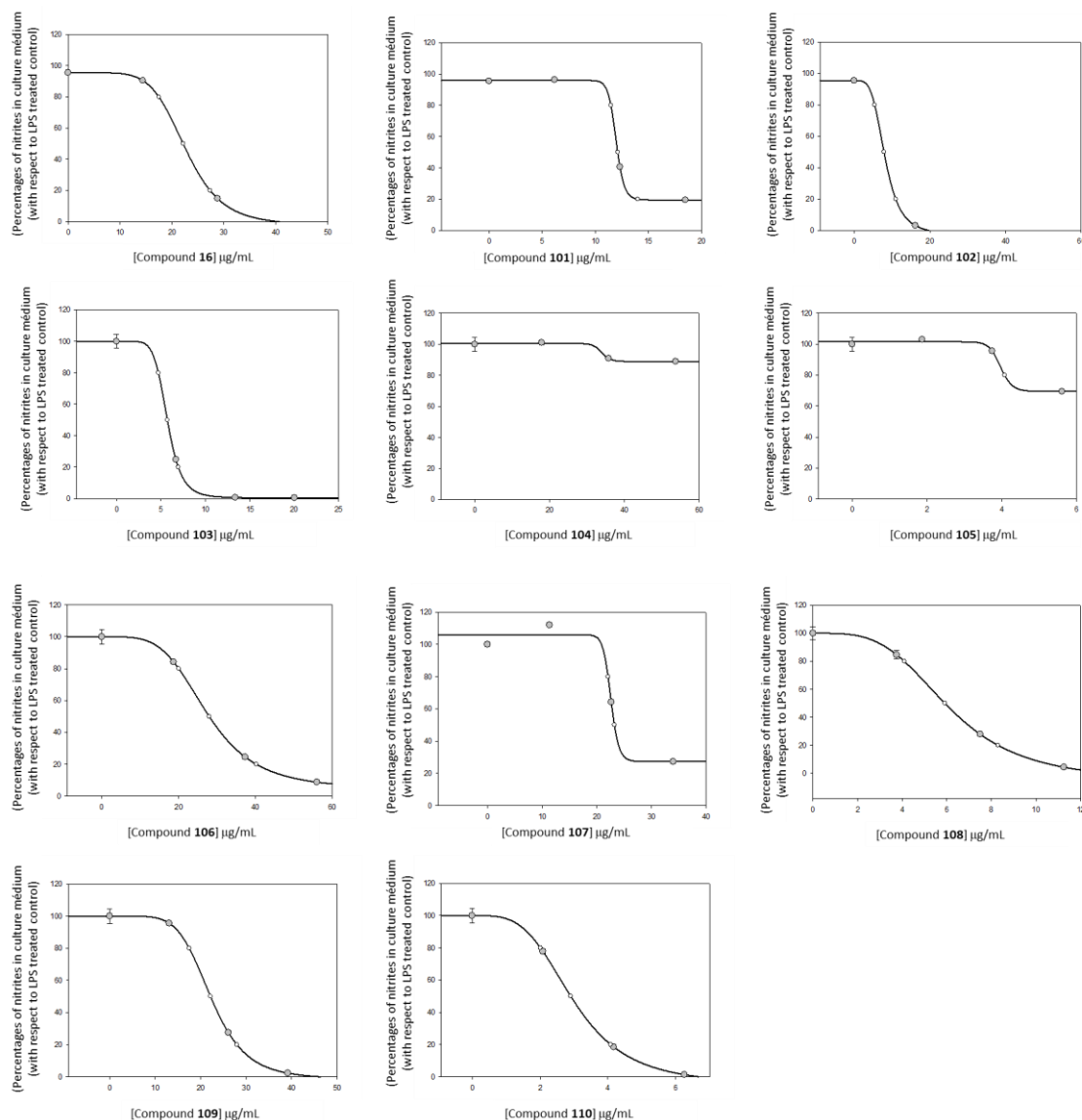


**Figure 35b.** Effect of compounds belonging to the **2<sup>nd</sup> group** on the release of nitrites assay in LPS activated RAW 264.7 macrophage murine cells at  $\frac{1}{4}IC_{50}$  (green bars),  $\frac{1}{2}IC_{50}$  (brown bars) and  $\frac{3}{4}IC_{50}$  (blue bars) concentrations, after **72 h** of treatment. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate

After 72h, the inhibition was, in general terms, even more pronounced than after 48h of treatment. At this time, all compounds displayed weak to strong inhibition of the inflammatory process, with percentage of inhibition of NO release between 11.6% and 100% at  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentrations. At all times assayed the lowest values of inhibition in NO were obtained at  $\frac{1}{4}IC_{50}$  concentrations.

The compounds **102**, still exerted the highest inhibition in the NO production with 100% at  $\frac{3}{4}IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}IC_{50}$  and 96.4% of inhibition of NO release at noncytotoxic concentrations  $\frac{1}{4}IC_{50}$  respectively. (Increasing a 4% with respect to the results found after 48h of treatment). Furthermore compounds **16**, **103**, **110**, **109**, **108**, and **106** showed also very intense inhibition in the NO production by 100%, 99.5%, 98.75%, 97.71%, 95.6% and

91.13% respectively at  $\frac{3}{4}$   $IC_{50}$  concentrations, Followed by compounds **101**, **104**, **105** and **107** with 77.75%, 11.06%, 30.16 and 72.74%, of depressed NO, respectively. At  $\frac{1}{4}$   $IC_{50}$  concentrations, Compounds **104**, **105** and **107** doesn't exert any inhibition activity in the NO release (0%). (Fig.35b)



**Figure 35c.** Sigmoidal curves of the effect of the **group II** products on the release of nitrites in RAW 264.7 macrophage murine cells, after 72 h of treatment. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.

In addition, to complete the anti-inflammatory effect of **group II** compounds, as well as we did for the group I compounds, we calculated the concentration to reduce by 50% the production of NO ( $IC_{50}$  NO) at the time assayed (Fig. 35c). The results showed that the strongest inhibitor of the NO production after 72h of treatment, is the salicylic aldehyde

**110** with  $IC_{50}$  NO value  $2.98 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$ , followed by compounds **105**, **103**, **108**, **102**, **101** with  $IC_{50}$  NO values  $4.74 \pm 1.27 \mu\text{g/mL}$ ,  $5.71 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ ,  $6.09 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ,  $7.98 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ ,  $10.7 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The weaker inhibitor compounds were **16**, **107**, **106**, **104** with  $IC_{50}$  NO values between  $22.02 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$  and  $31.37 \pm 4.90 \mu\text{g/mL}$ , respectively.

### 2.3. Cell cycle Arrest and Distribution

Flow and laser scanning cytometry is recently one of the most used quantitative analytical instrumentation and methodology in the cell biology. The possibility of rapid measurement of a multitude of cell attributes in a large cell population with the high accuracy by cytometry led to wide use of this instrumentation in studies of cell proliferation (cell cycle) and death. Applications of cytometry in the field of cell cycle analysis serve essentially the purpose of measuring the cellular DNA content, with the aim of: (1) revealing cell distribution within the major phases of the cell cycle (G0/G1 versus S versus G2/M), (2) disclosing the DNA ploidy of the measured cell population, (3) discrimination between noncycling (Go; quiescent) and proliferating cells.

Since anti-inflammatory effect can be related to the ability of changing the inflammatory processes induced by LPS in RAW264.7 cells, including monocyte/ macrophage cell differentiation and cell cycle arrest, we analyzed cell-cycle distribution in these cells in respond to LPS and the compounds **91** and **97**. For this purpose, flow cytometry by propidium iodide (PI) stained was used to measure DNA ploidy as well as the distribution of cells in each of cell cycle phases (Fig.36).

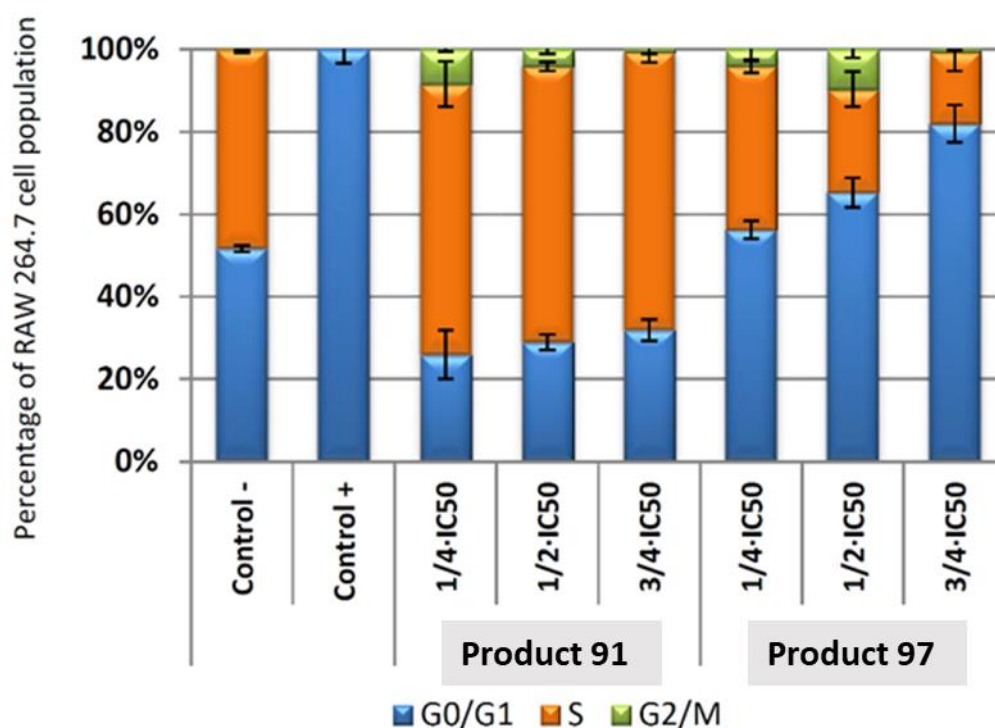
In this case, the compounds with highest anti-proliferative effects were the compounds **97** ( $IC_{50} = 6.97 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ ) and **91** ( $IC_{50} = 11.64 \pm 1.24 \mu\text{g/mL}$ ). These compounds were selected to determine the changes of cell cycle in RAW 264.7 cells treated with LPS, at different sub-cytotoxic concentrations ( $\frac{1}{4}IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}IC_{50}$  and  $\frac{3}{4}IC_{50}$ ), after 72h of treatment. Over and above that, an important anti-inflammatory effects were observed for compounds **91** and **97** with a percentages of NO release inhibition of the 80.3 % and 91.2% respectively.

LPS treatment of RAW 264.7 cells produced the detention of cell cycle in G0/G1 phase (positive control), with the fading of the cells in rest of the cell cycle phases, S and G2/M.

DNA histogram analysis showed that the compounds **91** and **97** were able to revert the cell cycle arrest induced by LPS.

After 72 h of treatment with product **91** and **97** we observed, a decrease of the cell number in the G0/G1 phase with the consequent increase of the number of cells in the S and G2/M phases, with respect to control cells (only LPS treated), which is related with the increase in DNA replication and progression.

With respect to compound **91**, we observed the same changes but in a subtle way. The proportion of cells in S phase after reaching 69%, remained constant at all the used concentrations. The cells proportion in G0/G1 phase decreased between 75% and 68% in a concentration dependent manner with respect to positive control (only LPS treated cells). Cells in G2/M phase, although decreased in a concentration dependent manner from 8% to 0, 3%, increased with respect to positive control cells, where not cells in this cell cycle phase were observed.



**Figure 36-a.** Percentage of RAW264.7 macrophage murine cells in the different phases of cellular cycle, G0/G1, S and G2/M. Cells were treated with LPS for 72 h, to induced inflammatory process, after that cells were treated with compound **91** and **97** for 72 h at its  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> and  $\frac{3}{4}$ IC<sub>50</sub> concentrations. In addition, results obtained for negative control (untreated cells) and positive control (cells only treated with LPS) are showed. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.



In contrast to dienone **91** effect after 72h, detailed Cell cycle analysis revealed that treatment with  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub> of hydroxyaldehyde **97** the proportion of cells in G0/G1 phase were higher than for the compound **91**, with respect to positive control the cells in this cell cycle phase decreased in a concentration dependent manner from a 44% to 19%. Cells in S phase decreased in a concentration dependent manner from 38% to 17%. In this case the changes in G2/M cells not was clearly dependent of the concentration.

The cell cycle change was more accentuated with the concentration increase (in a dose dependent manner), therefore compound **97** is prolonging the G0/G1 phase of the induced macrophages and reducing their entry into the S-phase, this suggests that hydroxyaldehyde **97**, triggered a cell cycle arrest in LPS-induced RAW264.7 cells by detention in G0/G1 phase at  $\frac{1}{2}$  and  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub> concentrations, which could be due to its protective<sup>144</sup> and its potent cytotoxic effect. However at  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> concentration the salicylaldehyde **97**, decreased the G0/G1 cell population with a concomitant increase in the S cell phase, allowing the cell differentiation, which means that the compound **97** reverts the cell cycle at this concentration.

These results showed that dienone **97** inhibited LPS-induced differentiation of RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner by increasing the proportion of cells in S phase and decreasing cell number in G0/G1 and G2/M phases. (Fig. 35). This recovery of cell cycle with respect to control cells (only LPS treated) could be a consequence of the anti-inflammatory effects produced by this product at the concentrations assayed. The hydroxyaldehyde, compound **97**, also had effects on the cellular cycle of RAW 264.7 cells recovering the cells from the G0/G1 full arrest produced in response to LPS action, in a dose-dependent manner increased the proportion of cells in G0/G1 phase and decreasing cell number in S phase and G2/M phases.

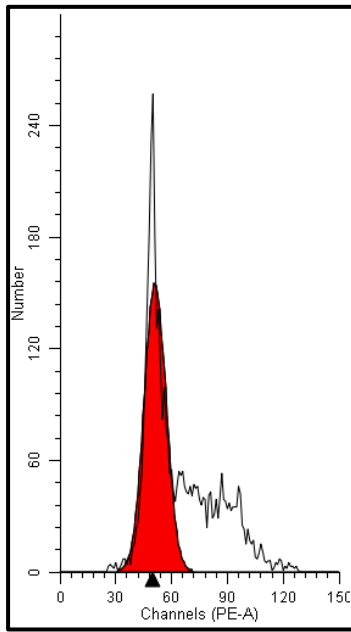
These results confirm that non-toxic doses of dienone **91** and hydroxyaldehyde **97**, modulate inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages inhibited in a dose-dependent manner the LPS induced cell cycle arrest and the NO releases. These inhibitory effects were more significant at  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub>, and tended to diminish over lower concentration treatment. These assays were performed under sub-cytotoxic concentrations ( $\frac{1}{4}$ IC<sub>50</sub>,

---

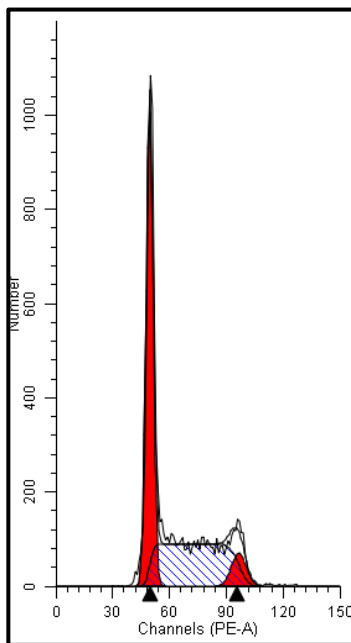
<sup>144</sup> Bonay, M., Roux, A., Floquet, J. et al. Caspase-independent apoptosis in infected macrophages triggered by sulforaphane via Nrf2/p38 signaling pathways. *Cell Death Discovery*, 2015, 1, 15022.

$\frac{1}{2}$ IC<sub>50</sub> and  $\frac{3}{4}$ IC<sub>50</sub> concentrations) of the compounds **91** and **97** to ensure that the possible anti-inflammatory effect was exclusively due to their anti-inflammatory properties and not to their cytotoxic effects.

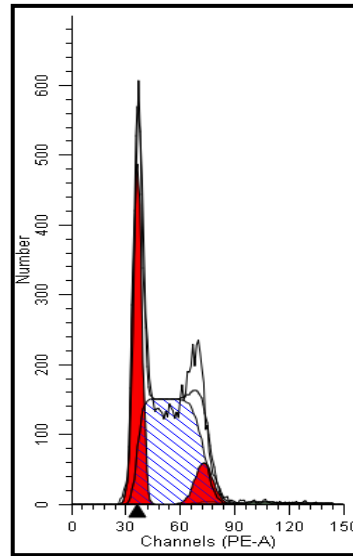
Thus, we have shown that all tested compounds exerts significant inhibition of NO release, as well as the immunomodulatory activities of the hydroxyaldehyde **97** and dienone **91** compounds, in activated RAW 264.7 macrophages, but these activities need to be more deepened in further studies.



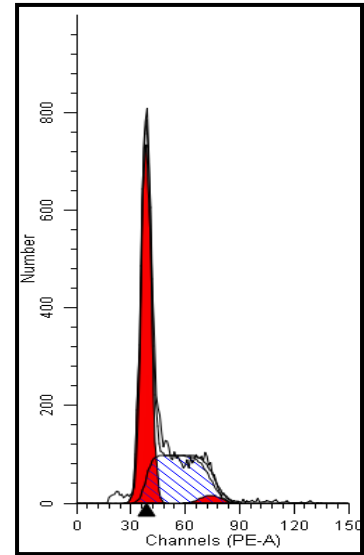
**Positive control**



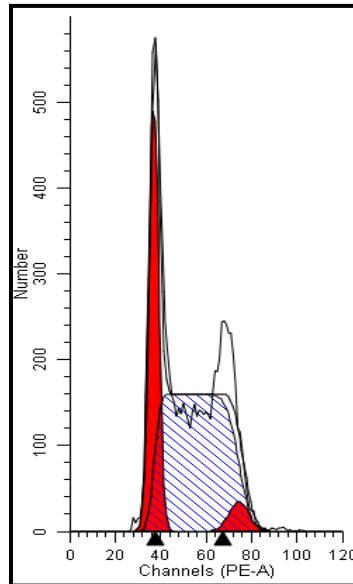
**Negative control**



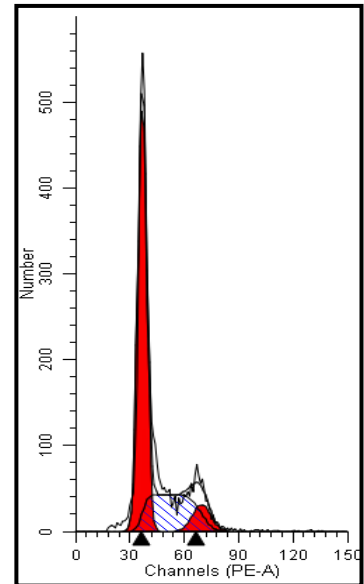
**91 ( $1/4$  IC<sub>50</sub>)**



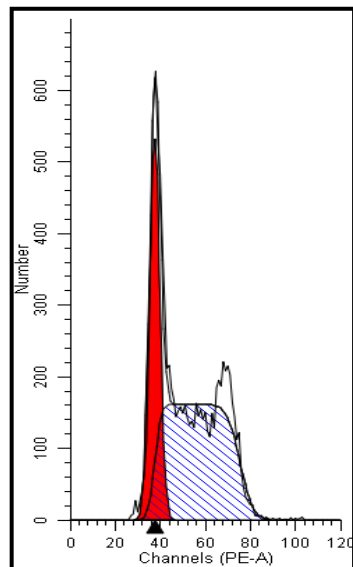
**97 ( $1/4$  IC<sub>50</sub>)**



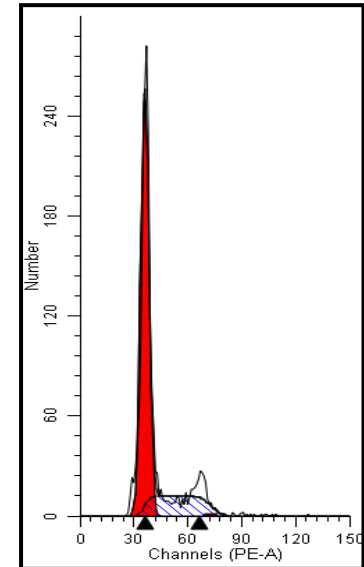
**91 ( $1/2$  IC<sub>50</sub>)**



**97 ( $1/2$  IC<sub>50</sub>)**



**91 ( $3/4$  IC<sub>50</sub>)**



**97 ( $3/4$  IC<sub>50</sub>)**

**Figure 36-b.** Cell-cycle histograms of RAW264.7 macrophage murine cells which were treated with LPS for 72 h, to induced inflammatory process. Then treated with compounds **91** and **97**, at their  $1/4 \times IC_{50}$ ,  $1/2 \times IC_{50}$  and  $3/4 \times IC_{50}$  concentrations. In addition, results obtained for negative control (untreated cells) and positive control (cells only treated with LPS) are showed. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.



# Discussion

Many known modern drugs are secondary metabolites with high biological activity. These secondary metabolites have been developed, in principle, with a clear objective defense and are essential for the plants that develop it, proof of this is the enormous and complex machinery that they use for their biosynthesis. Secondary metabolites, are, as already mentioned in the introduction, those who do not yet belong to basic or primary processes, confer certain selective advantages on the organism that develops them.<sup>145</sup>

Among many of these naturally occurring compounds exist diterpenes, group to which cassanes belongs. These compounds have presented a multitude of highly beneficial bioactive and / or biofunctional properties, as reflected in the introduction (CAPITULO I), with very high efficiency rates. Natural cassane diterpenes<sup>11, 9b, 18</sup> are well-known for their wide range of pharmacological activities, with antitumoral,<sup>20, 146</sup> antimalarial, antiinflammatory, antiviral,<sup>147</sup> antimicrobial,<sup>148</sup> and antitrypanosomal effects.<sup>149</sup>

However, and despite their clearly demonstrated interest, the difficult obtaining of these metabolites and their low proportion in their natural sources, represents a considerable limitation, not only to carry out detailed studies of their biological properties, but also to achieve industrial applications capable of exploiting the potential of these metabolites

In this sense, we have focused our work on the search for new molecules capable of being useful for the treatment of cancer and pathologies related to inflammation process. Specifically, we have evaluated the antitumor and anti-inflammatory therapeutic potential of cassane-type synthetic diterpenes and their structural analogues and related, starting

---

<sup>145</sup> Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *insight prohress* . 2001;411(June):1–5. 3

<sup>146</sup> Yodsaoe O, Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Chantrapromma S, Fun HK, Kanjana-Opas A. Phanginin A-K, diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. *Phytochemistry*. 2008;69(5):1242–9.

<sup>147</sup> a) Jiang RW, But PPH, Ma SC, Ye WC, Chan SP, Mak TCW. Structure and antiviral properties of macrocaesalmin, a novel cassane furanoditerpenoid lactone from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. *Tetrahedron Lett*. 2002;43(13):2415–8. b) Jiang RW, Ma SC, He ZD, Huang XS, But PP, Wang H, Chan SP, Ooi VE, Xu HX, Mak TC. Molecular structures and antiviral activities of naturally occurring and modified cassane furanoditerpenoids and friedelane triterpenoids from *Caesalpinia minax*. *Bioorganic Med Chem*. 2002;10(7):2161–70.

<sup>148</sup> a) Sudhakar C, Reddy PR, Raju TV, Das B. Interesting transformations of naturally occurring cassane diterpenoids and bioevaluation of the products. *Tetrahedron Lett*. 2012;53(30):3850–2. b) Ragasa CY, Hofileña JG, Rideout JA. New furanoid diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. *J Nat Prod*. 2002;65(8):1107–10.

<sup>149</sup> a) Mendoza DT, González LDU, Ortega-Barría E, Capson TL, Rios LC. Five new cassane diterpenes from *Myrospermum frutescens* with activity against *Trypanosoma cruzi*. *J Nat Prod*. 2003;66(7):928–32. b) Torres-Mendoza D, Ureña González LD, Ortega-Barría E, Coley PD, Kursar TA, Capson TL, McPhail K, Cubilla-Rios L. Novel cassane and cleistanthane diterpenes from *Myrospermum frutescens*: Absolute stereochemistry of the cassane diterpene series. *J Nat Prod*. 2004;67(10):1711–5.

from much more affordable and economically profitable, and even commercial compounds.

---

## *ANTICANCER ACTIVITIES*

---

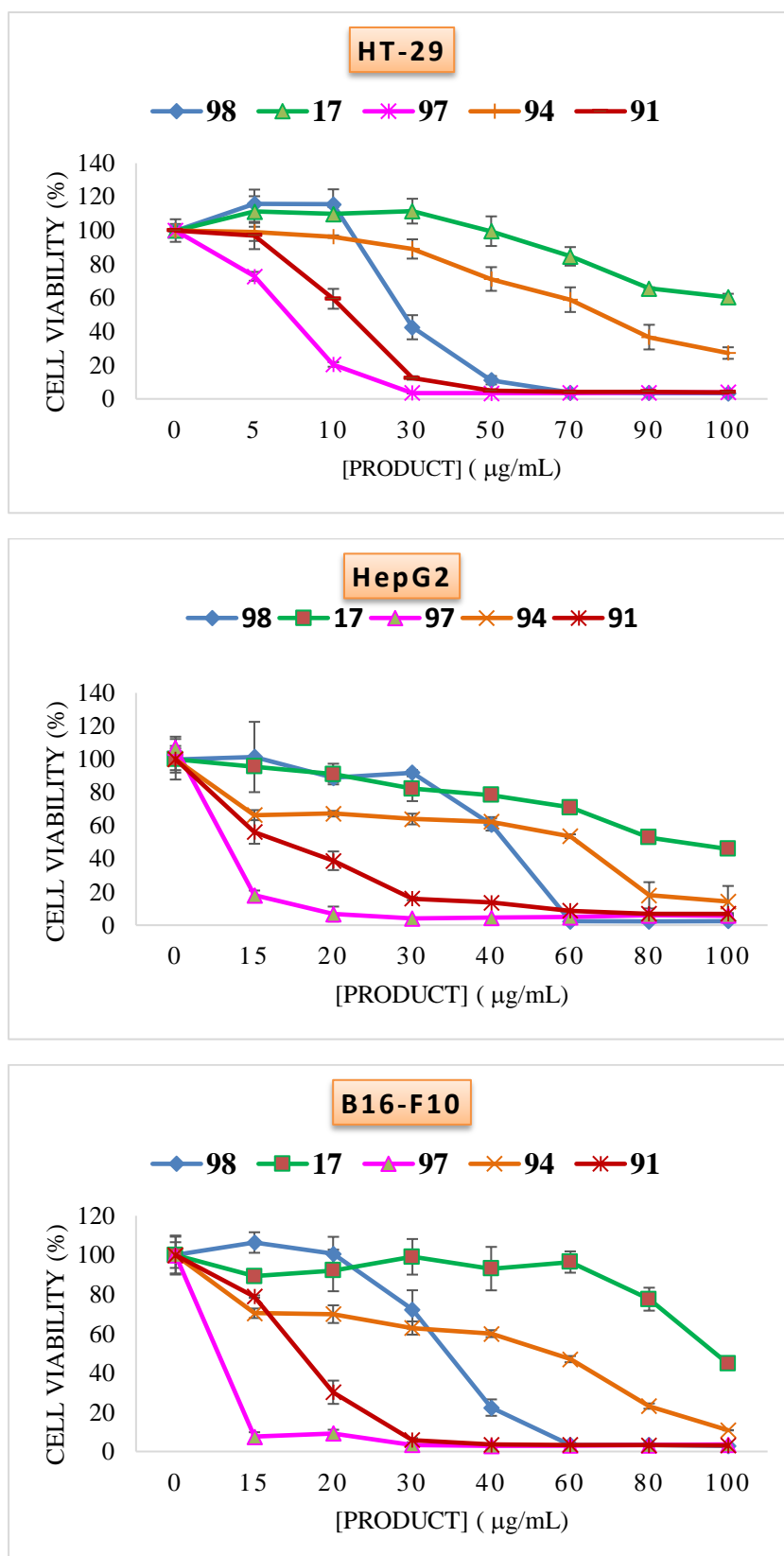
### **1. Induced cytotoxicity of Cassane-type diterpenoids and analogues on cancer cell lines**

According to the WHO, Cancer is the main cause of disease and the second cause of death from disease in the world after cardiovascular diseases. The numbers of new cases and deaths are expected to increase in the coming years with estimations for the year 2030 of 22.2 million new cases and 13.2 million deaths per year.

In this thesis, it has been tried to evaluate, as aforementioned, the antitumor effect of the newly synthesized products: the finale molecules as well as of various synthesis intermediates and derivatives, on the cell viability of tumor cell lines (colon, skin and liver).

The cytotoxic effect of the tested compounds was determined in three cancer cell lines (HT-29, B16F10 and HepG2). The cell viability assay was carried out after 72 hours of treatment. This incubation time was selected, apart from being common in this type of study, also due to the fact that a long incubation period would allow to study, with greater precision, the pathways through which our compounds could carry out their cytotoxic effect. Under these conditions, the concentrations of  $IC_{50}$  and  $IC_{80}$  were determined in all studied cell lines, being used as objective concentrations in the rest of the tests.

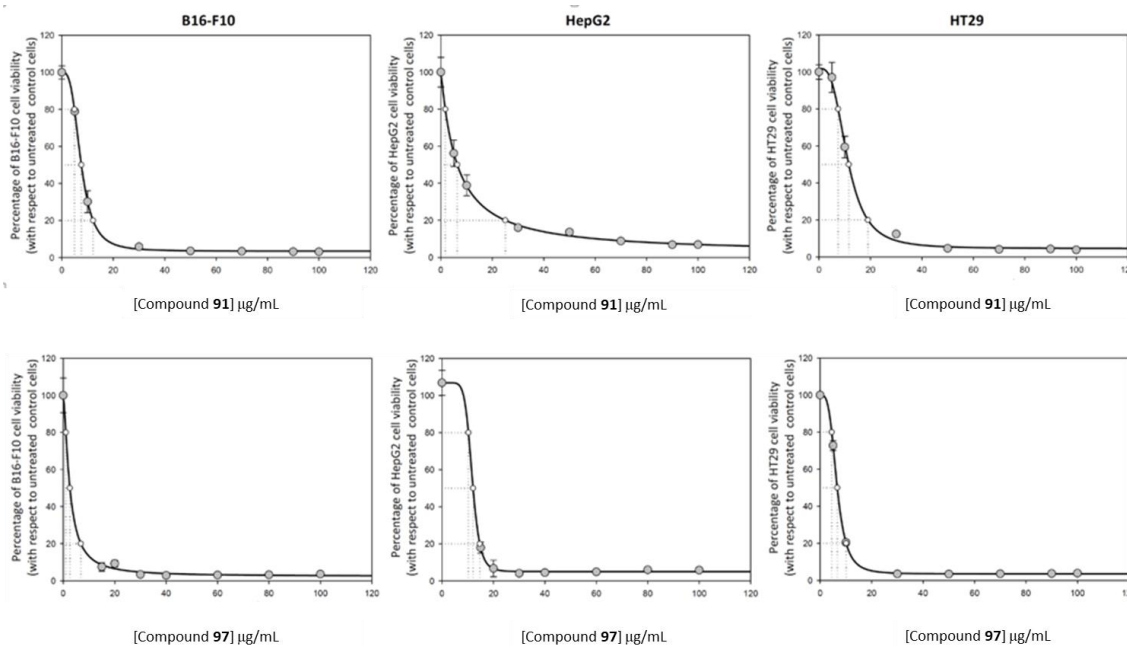
As mentioned in the results chapter, in all the used cell lines, our compounds showed a dose-dependent decrease in the number of viable cells after 72h of treatment. We take the products of **group I** as an example, we can notice from the figure 37 that all compounds exert an antiproliferative effect and decrease the number of viable cancer cells in dose-dependent manner.



**Figure 37a.** Variation of cell viability percentage's in the different tested cell lines at increasing concentrations of group I products after 72 h of treatment. Cell growth inhibition was analyzed by the MTT viability assay.



This inhibition starts from low concentrations (5  $\mu\text{g/mL}$ ) of the compounds **91**, **94** and **97** in all cell lines, but not for the compounds **17** and **98** (cell decrease starts from 15  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 37b.** Effects of compounds **91** and **97**, on the viability of B16-F10, HT29, and HepG2 cancer cells, after treatment with the compounds for 72 h in a range of 0 to 100  $\mu\text{g/mL}$ , each point represents the mean value  $\pm$  SD of at least two independent experiments performed in triplicate.

On the other hand, we have determined the compound concentrations required for 20% and 80% of growth inhibition ( $\text{IC}_{20}$  and  $\text{IC}_{80}$ ) to analyze the complete range of cytotoxicity, determining the acute or gradual response of cancer cells, to the compounds **91** and **97**. The best results were achieved by compound **91** and **97** with  $\text{IC}_{50}$  concentrations lower than 12  $\mu\text{g/mL}$  in the three cancer-cell lines ( $\text{IC}_{20}$  between 0.92 to 9.19  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{IC}_{50}$  between 1.91 to 11.53  $\mu\text{g/mL}$  and  $\text{IC}_{80}$  between 5.43 to 27.24  $\mu\text{g/mL}$ ).

Generally, we observe that all the analyzed compounds present a powerful cytotoxic activity, highlighting among them the compounds **91**, **97**, **105**, **108**, **110**, **119**, **122** and **131** which were strongly cytotoxic in the three studied cancer cell lines.

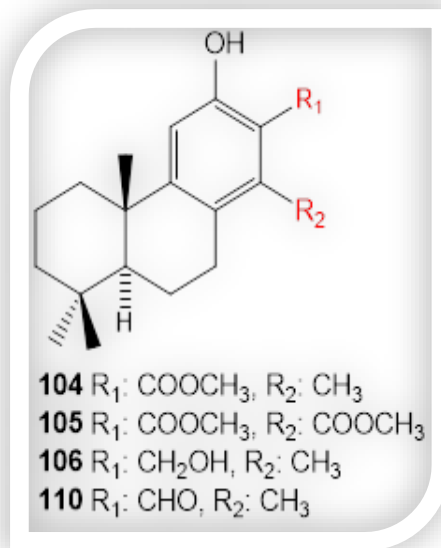
The best cytotoxic effects against cancer cell lines and RAW264.7 macrophages were summarized in the table 20:

CANCER CELL LINES	RAW264.7 MACROPHAGES	
1 <sup>st</sup> GROUP	The best results were achieved by compound <b>91</b> and <b>97</b> with IC <sub>50</sub> concentrations values $11.50 \pm 0.74$ , $6.36 \pm 1.62$ , $7.63 \pm 0.42$ $\mu\text{g/mL}$ and $6.63 \pm 0.21$ , $12.50 \pm 1.85$ , $2.55 \pm 1.29$ $\mu\text{g/mL}$ , in HT-29, HepG2 and B16F10 respectively.	The best results were achieved by compound <b>91</b> and <b>97</b> with IC <sub>50</sub> concentrations values $11.64 \pm 1.24$ and $6.97 \pm 0.33$ $\mu\text{g/mL}$ respectively.
2 <sup>nd</sup> GROUP	The compounds <b>105</b> , <b>108</b> and <b>110</b> were the most potent cytotoxic in all the three cell lines with IC <sub>50</sub> values: ( $5.96 \pm 0.55$ , $8.15 \pm 0.10$ , $5.96 \pm 0.55$ ), ( $3.87 \pm 0.98$ , $11.75 \pm 0.15$ , $10.34 \pm 0.74$ ), ( $3.54 \pm 0.19$ , $8.41 \pm 0.30$ , $2.38 \pm 0.39$ ) $\mu\text{g/mL}$ in HT-29, HepG2 and B16F10 respectively.	The compounds <b>104</b> , <b>105</b> , <b>108</b> and <b>110</b> were the most potent cytotoxic among all tested products from this group, with IC <sub>50</sub> values: ( $13.11 \pm 1.51$ $\mu\text{g/mL}$ ), ( $7.49 \pm 0.86$ $\mu\text{g/mL}$ ), ( $14.99 \pm 0.32$ $\mu\text{g/mL}$ ) and ( $8.34 \pm 2.51$ $\mu\text{g/mL}$ ) respectively.
3 <sup>rd</sup> GROUP	hydroxyaldehyde <b>119</b> and lactol <b>122</b> desmethyl analogues of <b>110</b> and <b>108</b> , showed the most potent antiproliferative activities with IC <sub>50</sub> values: ( $5.19 \pm 0.17$ , $8.36 \pm 1.77$ , $4.33 \pm 0.27$ ) and ( $5.14 \pm 0.21$ , $11.01 \pm 0.12$ , $6.28 \pm 0.74$ ) $\mu\text{g/mL}$ in HT-29, HepG2 and B16F10 respectively.	hydroxyaldehyde <b>119</b> , diol <b>120</b> , lactol <b>122</b> and <i>o</i> -hydroxyethyl phenol <b>123</b> , showed the most potent antiproliferative activities with IC <sub>50</sub> values: ( $5.87 \pm 0.18$ $\mu\text{g/mL}$ ), ( $13.94 \pm 0.07$ $\mu\text{g/mL}$ ), ( $14.03 \pm 0.23$ $\mu\text{g/mL}$ ) and ( $14.46 \pm 0.09$ $\mu\text{g/mL}$ ) respectively
4 <sup>th</sup> GROUP	The best cytotoxic potential was reached by the compound <b>131</b> (the bicyclic or tricyclic analogue of diol <b>106</b> ) with IC <sub>50</sub> values ( $2.45 \pm 0.29$ , $3.25 \pm 0.33$ and $3.84 \pm 0.45$ ) $\mu\text{g/mL}$ in HT-29, HepG2 and B16F10 respectively	The best cytotoxic potential was reached by the compound <b>131</b> (the bicyclic or tricyclic analogue of diol <b>106</b> ) with IC <sub>50</sub> values $3.98 \pm 0.25$ $\mu\text{g/mL}$ .

**Table 20:** The best cytotoxic effects against cancer cell lines and RAW264.7 macrophages.

From the results chapter findings data, we can conclude the following preliminary SAR (Structure–activity relationship) analysis for cytotoxic activities:

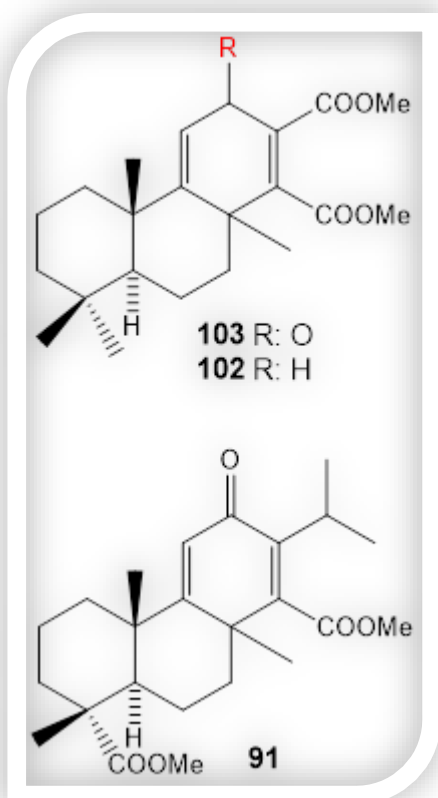
### TRICYCLIC CASSANE DITERPENOIDS AND ANALOGUES



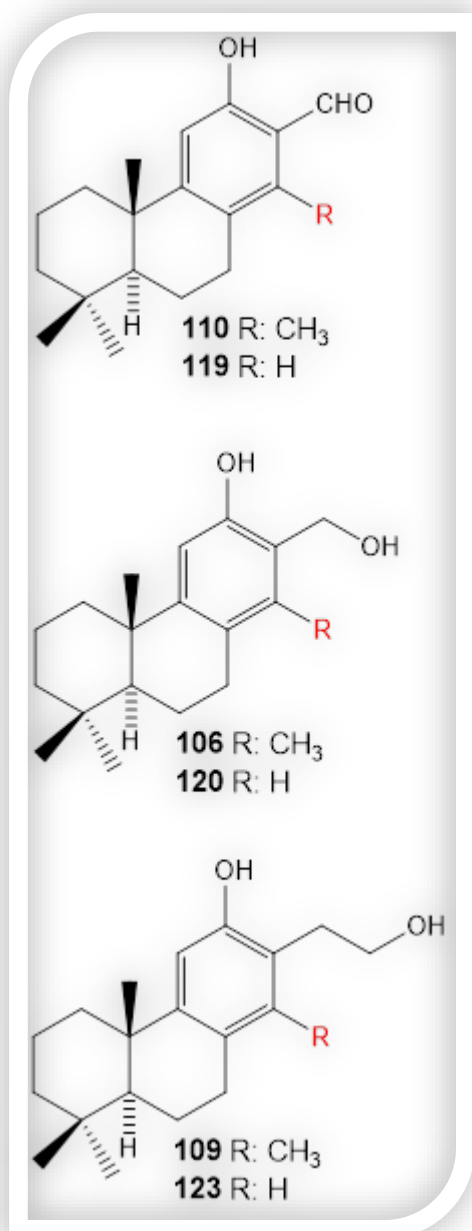
◆ The **C-14** position (**Ester** versus **Methyl** substitution): the ester enhanced the antiproliferative effect against adenocarcinoma cells HT29, hepatocarcinoma cells HepG2 and RAW264.7 macrophages, but not against the skin melanoma cells B16F10. (**104 Vs 105**)

◆ The **C-13** position (**Ester** versus **Aldehyde** substitution): the ester diminish the cytotoxic effect of the tricyclic cassane diterpenoids in all the tested cell lines. (**104 Vs 110**)

◆ The **C-13** position (**CH<sub>2</sub>OH** versus **CHO** substitution): CH<sub>2</sub>OH group diminish more strongly, the cytotoxic potential of the tricyclic cassane diterpenoids in all the tested cell lines. (**106 Vs 110**)



◆ The **C-12** position ( **$\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety**): the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety enhanced the antiproliferative effect of the tricyclic cassane diterpene against all the studied cell lines. The dienone **103** is strongly more cytotoxic than the compound **102** which does not present the carbonyl moiety at C12, this deduction was furthermore confirmed by the powerful antiproliferative activity of the dienone **91**, presenting also the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety, in all cell lines. (**102 Vs 103 Vs 91**)



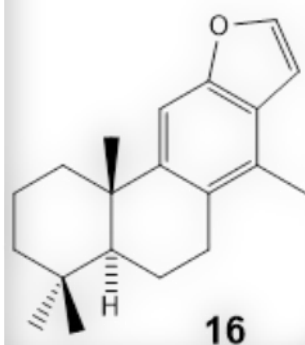
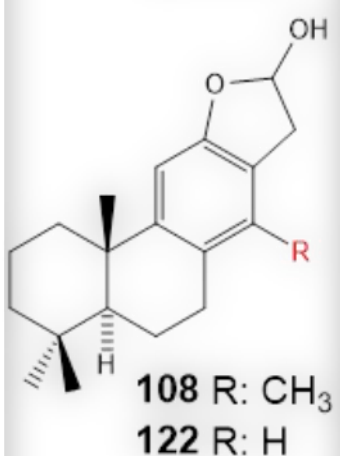
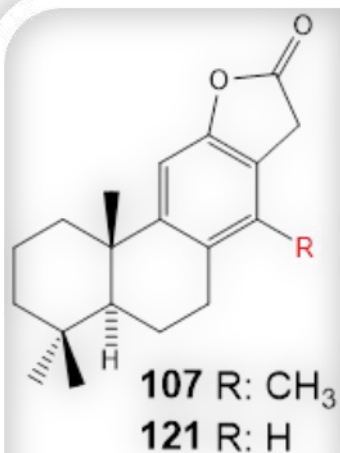
♦ The **C-14** position (**Methyl** substitution):

\*The presence of CH<sub>3</sub> group enhanced the antiproliferative activity of the hydroxyaldehyde against the adenocarcinoma HT29 cells and the melanoma B16F10 cells, but it has worsened the cytotoxicity effect in RAW264.7 macrophages and it doesn't make a difference in the hepatocarcinoma HepG2 cells (**110 Vs 119**)

\*The CH<sub>3</sub> group diminished the cytotoxic effect of the diol against adenocarcinoma the adenocarcinoma HT29 cells, the melanoma B16F10 cells and RAW264.7 macrophages, but improved the activity against the hepatocarcinoma HepG2 cells (**106 Vs 120**)

\*The presence of CH<sub>3</sub> group increased the activity in all the studied cell lines. (**109 Vs 123**)

## TETRACYCLIC CASSANE DITERPENOIDS AND ANALOGUES

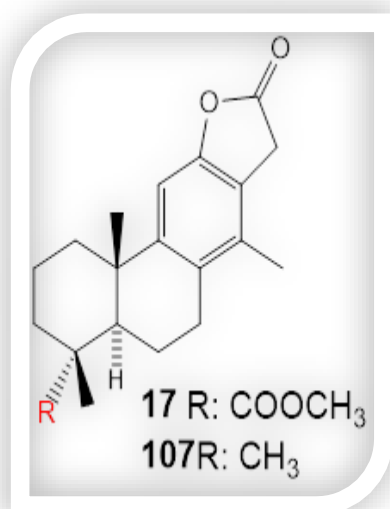


◆ **Lactol, lactone and furan cassane diterpenoids D ring:**

The most potent cytotoxic tetracyclic cassane framework was the lactol D ring followed by the furan and finally the lactone in all the tested cancer cell lines. Nevertheless, concerning the antiproliferative effect against RAW264.7 macrophages, the lactol was the most potent followed by the furan ring and finally the butanolide lactone (**107** Vs **121** and **16**)

◆ The **C-14** position in **lactone** (**Methyl** substitution): the CH<sub>3</sub> group enhanced the antiproliferative activity of the lactone cassane diterpenoid against the hepatocarcinoma HepG2 cells, the melanoma B16F10 cells and RAW264.7 macrophages, but no differences were observed regarding the adenocarcinoma HT29 cells. (**107** Vs **121**)

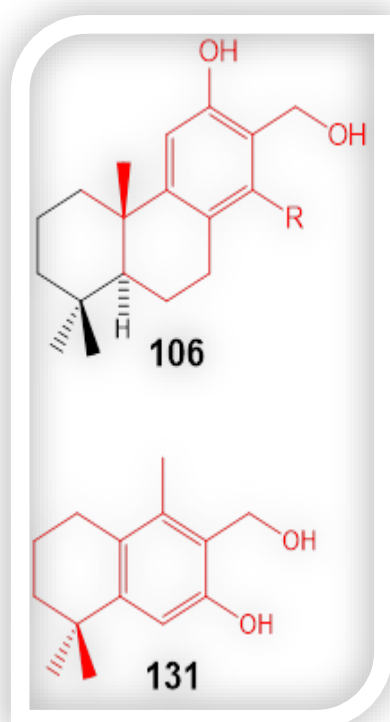
◆ The **C-14** position in **lactol** (**Methyl** substitution): the CH<sub>3</sub> group enhanced the antiproliferative activity of the lactol cassane diterpenoid against adenocarcinoma HT29 cells, no differences were observed regarding the hepatocarcinoma HepG2 cells and RAW264.7 macrophages, finally the methyl group diminish the cytotoxic effect of the lactol cassane diterpenoid against the melanoma B16F10 cells. (**105** Vs **122**)



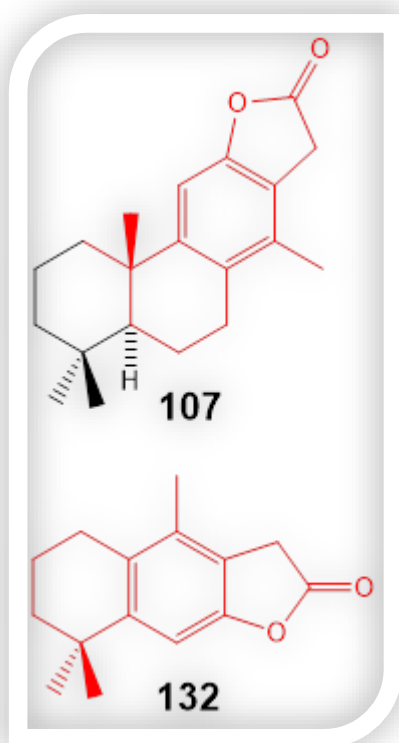
◆ The **C-18** position (**COOMe** Versus **CH<sub>3</sub>** substitution), the COOMe group diminish the antiproliferative effect against all studied cancer cell lines, while it improved the cytotoxicity against RAW264.7 macrophages.

## BICYCLIC OR TRICYCLIC CASSANE ANALOGUES

### BICYCLIC



◆ Decreasing the tricyclic cassane diterpenes molecular weight, in general, leads to a significant drop in cytotoxic activities against all the studied cell lines, excepting in the case of the monoterpenic cassane analogues **131** which was the most active compounds even actually more potent than its correspondent cassane diterpene **106**

TRICYCLIC

◆ Decreasing the tetracyclic cassane diterpenes molecular weight improved the cytotoxic activities in all the studied cell lines. (107 Vs 132)

After the cytotoxicity analysis, we observed that among all the analyzed cell lines, the great activity ( $IC_{50}$ :  $7.63 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$  and  $2.55 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$ ) presented by products **91** and **97** against the murine melanoma cell line B16F10 stood out, this line is also among the most used cells in the *in vitro* and *in vivo* biological study and experimental treatment of skin cancer. For all this, we believe that it is convenient to use this cell line to determine the process by which products **91** and **97** exert these antiproliferative effects.

## 2. Dienone **91** and Hydroxyaldehyde **97** induced cell cycle arrest in B16F10 cell line

Cell division and death are two of the main processes that regulate the homeostasis of normal tissues. The alteration of these processes, that is, aberrant entry or progression in the cell cycle or uncontrolled cell proliferation, plays a fundamental role in the development of cancer<sup>150</sup>. Due to this, great efforts are devoted to knowing the regulation

<sup>150</sup> a) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. b) Sheppard KE, McArthur GA. The cell-cycle regulator CDK4: An emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5320–8.

and components of the cell cycle in order to find new effective treatments against cancer. In recent decades, great strides have been made in cancer treatment, thanks in part to a better understanding of the basic mechanisms that regulate the cell cycle. In fact, the use of cell cycle regulatory drugs is one of the main mechanisms used against cancer <sup>151</sup>

The decrease in cell proliferation of cells in an *in vitro* culture, caused by a product, can occur through several ways: First, it is necessary to distinguish between the cytotoxic or cytostatic effect of the product in question. If the product exerts a cytostatic effect, it will prevent cell division and, therefore, the inhibition of proliferation will not be due exclusively to cell death, but the antiproliferative effect generated by the proportion of arrested cells must be added<sup>152</sup>. Although this cytostaticity can also be mediated by a decrease in the rate of division without producing cell death, thus causing a slowdown in the proliferation of the culture. In the case that the action of the compound is completely cytotoxic, the cells that continue to evolve throughout their cell cycle should not be affected except to enter the process of cell death, without entering the arrest of their cycle.

The analysis of the cell cycle is carried out, among other techniques, by staining the nuclear DNA with propidium iodide, which allows us to know exactly what proportion of cells is found in each of the phases of the cell cycle immediately since the union of propidium iodide with DNA is produced stoichiometrically, thus knowing the DNA content. (See materials and methods section)

The number of cells in each phase of the cell cycle can be quantified by flow cytometry using a FACS (fluorescent activated cell sorter) analyzer. This proportion of cells in each phase of the cycle will vary greatly depending on which cell type is investigated, thus, for example, in the case of completely normal cells, the proportion of cells in the G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> phase should be close to 90 %, the rest of the cell population being distributed among the other phases of the cycle. However, in cancer cells this proportion will be somewhat

---

<sup>151</sup> a) Nwabo Kamdje AH, Seke Etet PF, Vecchio L, Muller JM, Krampera M, Lukong KE. Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell Signal*. 2014;26(12):2843–56. b) Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Wojciechowski J, Horky M. Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: A comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. *Pol J Pharmacol*. 2004;56(5):635–41.

<sup>152</sup> a) Sena G, Onado C, Cappella P, Montalenti F, Ubezio P. Measuring the complexity of cell cycle arrest and killing of drugs: Kinetics of phase-specific effects induced by taxol. *Cytometry*. 1999;37(2):113–24. b) Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, Williams J. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat Med*. 1997;3(9):1034–6.



lower, depending on the line considered. Around 60% of cells must be found in the G0 / G1 phase (according to our results) since in these malignant cell types the rate of cell division is considerably faster than in normal cells.

Taking into account all these considerations, the proportion of B16 F10 cells in each phase of the cell cycle was determined at 72h of incubation at the IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations of compounds **91** and **97**, calculated in the cytotoxicity assays.

Simple	[ Conc ] (µg/mL)	G0/G1	S	G2/M
<b>Control</b>		57,62 ± 1,30	39,21 ± 3,81	3,16 ± 2,75
<b>Product 91</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	60,04 ± 0,67	38,83 ± 2,18	1,12 ± 1,94
	<b>IC<sub>80</sub></b>	76,36 ± 1,18	22,42 ± 2,21	1,22 ± 1,11
<b>Product 97</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	71,87 ± 2,63	27,94 ± 2,63	0,18 ± 0,22
	<b>IC<sub>80</sub></b>	70,55 ± 2,55	29,44 ± 2,55	0,00 ± 0,00

**Table 21.** Percentage of B16F10 cells in each of the different phases of the cell cycle, in response G0/G1, S and G2/M, in response to treatment with **91** and **97** for 72 h, at its IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations. Values are expressed as means ± } S.E.M

As mentioned in the results section, we verified how, after 72 hours of treatment, a dose-dependent cell cycle blockage occurs in G0/G1, by the hydroxyaldehyde **97** at IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentration, while the dienone **91**, produced a significant cell-cycle arrest, increasing the number of cells in the G0/G1 phase (76.36% ) only at IC<sub>80</sub> concentration, nevertheless it did not exert significant effect at IC<sub>50</sub> concentration, probably due to apoptotic and its cytotoxic effects. These increases were associated with the consequent reduction of cells in the S and G2/M phases.

The cell cycle blockage produced in the G0/G1 phase, is almost associated with the prevention of the damaged DNA replication. This block may be due to several factors, such as the inactivation or decrease of cyclin D1 or the induction of inhibitory proteins of CDKs, such as p27<sup>153</sup>. To find out which factors are involved in this blockage cell cycle,

<sup>153</sup> Yoon MK, Mitrea DM, Ou L, Kriwacki RW. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(5):981–8.

analysis of the proteins expression related to the control of this process using technics such as western blot should be furtherly carried out.

The induction of cell cycle arrest by other cassane-type diterpenoids, has been narrowly documented, thus, in 2016, Han Bao et al. described the G1 phase cell cycle inhibition and arrest in ovarian cancer cells A2780 after 24 hours of treatment by a furanocassane diterpenoid named, phanginin R. that they have isolated from the seeds of *C. Sappan*.<sup>154</sup>

### **3. Dienone 91 and Hydroxyaldehyde 97 induced apoptosis in B16F10 cell line**

A blockage in the pathways leading to apoptosis can promote tumorigenesis and even make tumor cells resistant to treatment<sup>155</sup>. Due to this, apoptosis is a very important target in cancer treatment, since its reinstatement or promotion allows the elimination of transformed and malignant cells<sup>156</sup>. Great advances in the understanding of apoptosis and its implication in the development of cancer have made it possible to develop therapies capable of restoring normal apoptotic pathways, selectively activating the tumor cells death<sup>157</sup>

Although the cell cycle and apoptosis appears to be antagonistic processes, there is a strong relationship between them. As we have mentioned previously, the balance between cell division and death is responsible for the homeostasis of normal tissues. Cell cycle arrest and apoptosis induction can be a good indicator of antitumor therapeutic action, depending on the drug considered. In fact, there are many trials that show that the mechanism of action of many antitumor agents affects the cell cycle, which in turn can lead to growth arrest, differentiation, or apoptosis<sup>158</sup>

---

<sup>154</sup> Bao H, Zhang LL, Liu QY, Feng L, Ye Y, Lu JJ, Lin LG. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* in cancer cells. *Molecules*. 2016 Jun;21(6):791.

<sup>155</sup> Hassan M, Watari H, Abualmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014.

<sup>156</sup> WANG Y, MA W, ZHENG W. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent targeting apoptosis, cell cycle arrest and anti-angiogenesis for cancer chemoprevention. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(2):215–9.

<sup>157</sup> a) Akhtar J, Wang Z, Yu C, Li CS, Shi YL, Liu HJ. STMN-1 is a potential marker of lymph node metastasis in distal esophageal adenocarcinomas and silencing its expression can reverse malignant phenotype of tumor cells. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1–13. b) Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med*. 2014;65:139–55.

<sup>158</sup> a) Hafidh RR, Abdulmir AS, Bakar FA, Jalilian FA, Abas F, Sekawi Z. Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of Mung bean sprouts. *BMC*

From the study of the cell cycle, by flow cytometry, it is possible to obtain a large amount of information, but, due to the limitations inherent to this method, it is difficult to distinguish between different processes of cell death, since it only reports on the particles quantification, based on its staining with propidium iodide. To quantify the extent of the apoptotic effect induced by our compounds, a more precise test was carried out, the determination of the annexin V-FICT labeling together with propidium iodide staining, by flow cytometry. This assay allows us to quantify the different cell populations based on their degree of apoptosis. Annexin V-FICT has a high affinity for the aminophospholipid phosphatidyl-serine. In normal cells, due to membrane asymmetry, this aminophospholipid is found mainly on the inner face of the cytoplasmic membrane. (See materials and methods section).

A low IP labeling and a high annexin V-FICT label indicate that the cell is fully immersed in the apoptosis process, but the integrity of the membrane remains intact, we call this phase [early apoptosis](#). On the other hand, a high labeling with IP and a low labeling with annexin V-FICT indicate that the cell has suffered the rupture of the cytoplasmic membrane without the translocation of the phosphatidylserine, indicating that we would be facing a process of [necrosis](#). Finally, if there is a high labeling in annexin V-FICT and in propidium iodide, we would find ourselves before a cell that has translocated phosphatidylserine, but has suffered at some point the loss of the integrity of the cytoplasmic membrane, probably during the formation of apoptotic bodies, we call this stage of the apoptosis process [late apoptosis](#). The quantification of these cell populations was carried out, as in the cell cycle analysis, by flow cytometry using a fluorescence activated counter or FACS analyzer (fluorescent activated cell sorter).

---

*Complement Altern Med.* 2012;12. b). Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *The lancet oncology.* 2004 Jan 1;5(1):27-36.

SAMPLE	TIME	[CONC.] ( $\mu$ G/ML)	Q3 NORMAL	Q4 EARLY AP.	Q2 LATE AP.	Q1 NECROSIS
<b>CONTROL</b> <b>91</b>	72h		87.40 $\pm$ 0.4	0.26 $\pm$ 0.1	3.60 $\pm$ 1.1	8.73 $\pm$ 1.0
	24h	IC <sub>50</sub>	91.86 $\pm$ 0.5	1.73 $\pm$ 0.2	4.20 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.4
		IC <sub>80</sub>	94.7 $\pm$ 0.2	0.10 $\pm$ 0.0	2.66 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.2
	48h	IC <sub>50</sub>	84.1 $\pm$ 0.6	3.73 $\pm$ 0.1	9.40 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.1
IC <sub>80</sub>		70.6 $\pm$ 0.8	12.06 $\pm$ 0.5	14.53 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.2	
<b>97</b>	72h	IC <sub>50</sub>	85.3 $\pm$ 1.7	0.06 $\pm$ 0.0	7.63 $\pm$ 3.0	6.9 $\pm$ 1.3
		IC <sub>80</sub>	47.4 $\pm$ 14.9	27.63 $\pm$ 5.8	21.13 $\pm$ 3.4	3.4 $\pm$ 1.6
	24h	IC <sub>50</sub>	86.1 $\pm$ 0.1	0.86 $\pm$ 0.1	5.96 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.3
		IC <sub>80</sub>	91.8 $\pm$ 0.0	1.13 $\pm$ 0.1	4.96 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3
	48h	IC <sub>50</sub>	64.9 $\pm$ 1.9	5.73 $\pm$ 0.6	27.13 $\pm$ 1.8	2.2 $\pm$ 0.2
		IC <sub>80</sub>	71.9 $\pm$ 1.2	6.93 $\pm$ 0.5	18.30 $\pm$ 1.8	2.8 $\pm$ 0.1
72h	IC <sub>50</sub>	75.9 $\pm$ 4.3	5.33 $\pm$ 0.7	17.03 $\pm$ 3.6	1.7 $\pm$ 0.1	
	IC <sub>80</sub>	23.5 $\pm$ 0.2	23.56 $\pm$ 0.2	17.66 $\pm$ 1.4	0.9 $\pm$ 0.4	

**Table 22.** Percentage of B16F10 cells in each of the different cell populations in response to apoptosis induced by products **91** and **97** for 72 hours. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M

In our work we verified how the antiproliferative effect of the hydroxyaldehyde **97** and the dienone **91** is mediated by the induction of apoptosis, producing a great reduction in cell viability in a dose-dependent manner. This reduction correlates with an increase in the apoptotic cell fractions. The induction of high percentages of apoptosis by compounds **91** and **97** is consistent with the arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase, since it has been revealed that cells exposed to certain agents usually enter apoptosis from a specific phase of the cell cycle <sup>159</sup>

The highest apoptotic levels were achieved at IC<sub>80</sub> and IC<sub>50</sub> concentrations after 72 hours of treatment by compounds **91** and **97** respectively. These results are in line with those found in the analysis of the cell cycle at 72h as we mentioned before (results chapter). Currently, the cytotoxicity mechanism(s) of cassane-type diterpenoids have scarcely been studied. The cell apoptosis mechanisms connecting of cassane diterpenoids from *C. sappan* have been investigated, the results reflected that phanginin D promoted the activity of caspase-3, along with the cleavage of procaspase-3 and poly ADP-ribose

<sup>159</sup>. Caba O, Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Boulaiz H, Aránega A, Gallo MA, Marchal JA, Campos JM. Anticancer activity and cDNA microarray studies of a (RS)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl]-6-chloro-9H-purine, and an acyclic (RS)-O,N-acetalic 6-chloro-7H-purine. *Eur J Med Chem*. 2011;46(9):3802–9.

polymerase (PARP), as well as phanginin R, which induced A2780 cells apoptosis in a dose-dependent way and could be proven by the enhanced cleaved-PARP, the ratio of Bax/ Bcl-2 and the expression of the p53 protein.<sup>144, 160</sup>

In addition, caesalpinG from *C. minax* contributed to AtT-20 cells apoptosis through promoting ER stress and suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, which is another different apoptosis mechanism.<sup>161</sup>

#### **4. Dienone 91 and hydroxyaldehyde 97 effects on mitochondrial membrane potential**

Mitochondria exert both vital and lethal functions in physiological and pathological scenarios<sup>162</sup>, they are essential for life, mainly owing to their role in the regulation of fundamental cellular functions and key biosynthetic processes such as ATP generation, it is not surprising that mitochondria have been implicated in multiple aspects of tumorigenesis and tumor progression and in apoptotic cell death<sup>163</sup>. Caspase protease activity is essential for apoptosis; once active, caspases cleave hundreds of different proteins leading to rapid cell death with distinctive biochemical and morphological hallmark. In general terms, caspase activity can be initiated either via cell surface death receptors the so called death receptor or extrinsic pathway<sup>164</sup> or through the mitochondrial, also called intrinsic, pathway of apoptosis<sup>165</sup>. Most stimuli induce apoptosis via the mitochondrial pathway; in this process, the defining event is mitochondrial outer membrane permeabilisation or MOMP. Thus, apoptosis can occur through two essential pathways, one being the intrinsic one, which causes mitochondrial disruption and leads to loss of mitochondrial membrane potential (MMP or  $\Delta\Psi_m$ ); by

---

<sup>160</sup> Tran MH, Nguyen MTT, Nguyen HD, Nguyen TD, Phuong TT. Cytotoxic constituents from the seeds of Vietnamese *Caesalpinia sappan*. *Pharm Biol.* 2015;53(10):1549–54.

<sup>161</sup> Li DM, Ma L, Liu GM, Hu LH. Cassane diterpene-lactones from the seed of *Caesalpinia minax* HANCE. *Chem Biodivers.* 2006;3(11):1260–5.

<sup>162</sup> Schimmer AD, O'Brien S, Kantarjian H, Brandwein J, Cheson BD, Minden MD, Yee K, Ravandi F, Giles F, Schuh A, Gupta V. A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2008;14(24):8295–301.

<sup>163</sup> Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 2008;18(4):165–73.

<sup>164</sup> Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res.* 2012;318(11):1269–77.

<sup>165</sup> Tait SW, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C, Green DR. Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev Cell.* 2010;18(5):802–13.

contrast, the induction of apoptosis without MMP changes may suggest the activation of the extrinsic apoptotic pathway.

Herein, we analysed the MMP to elucidate the possible mechanism involved in the apoptotic responses of the selected derivatives (**91** and **97**) in B16F10 melanoma cell line at their respective IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> concentrations, for 72 h. Changes in MMP were examined by monitoring cell fluorescence after double staining with rhodamine 123 (Rh123) and PI. A negative Rh123 staining suggests an intrinsic apoptotic activation pathway, whereas a positive Rh123 staining an extrinsic apoptotic pathway. (See materials and methods section)

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rh123 +	Rh123 –
Control		93.57 $\pm$ 0.35	6.43 $\pm$ 0.35
Product <b>91</b>	IC <sub>50</sub>	90.47 $\pm$ 5.10	9.53 $\pm$ 5.10
	IC <sub>80</sub>	84.73 $\pm$ 8.28	15.27 $\pm$ 8.28
Product <b>97</b>	IC <sub>50</sub>	89.87 $\pm$ 0.91	10.13 $\pm$ 0.91
	IC <sub>80</sub>	64.13 $\pm$ 5.17	35.87 $\pm$ 5.17

**Table 23.** Percentage of Rh123 positive and negative B16-F10 cell population in response to the treatment by **91** and **97** for 72 h, with respect to the control untreated cells. Values are expressed as means  $\pm$  } S.E.M

**Dienone 91:** at IC<sub>50</sub> the cell population of Rh123 positive and Rh123 negative is about 90.47 % and 6.43 % respectively ( with only 3% difference respecting to the control cell population ) so we conclude that dienone **91** does not induce modifications in the mitochondrial membrane potential, thus we can conclude that the high cytotoxicity of this compound, caused the disappearance of this cell population at this time and concentration, this data has a good correlation with the previous results concerning apoptosis and cell cycle distribution ( dienone does not induce significant effects in apoptosis neither in the cell cycle arrest and distribution at IC<sub>50</sub> neither after 72 hours of treatments )

At IC<sub>80</sub>, there is some changes in the both Rh123 cell population in comparison with untreated cells but still no remarkable differences, (84.73 % Vs 93.57% Rh123+ and 15.27% Vs 6.43 % Rh123-), so that this compound induced apoptosis in B16F10 melanoma cells at this concentration, these results also concords with the apoptosis and cell cycle data information, therefore, we can suggest that the dienone 64 induced the

activation of the extrinsic apoptotic pathway, since at this time and concentrations this product is clearly apoptotic.

**Hydroxyaldehyde 97:** At IC<sub>50</sub> the cell of Rh123 positive and Rh123 negative is about 89.87 % and 10.13 % respectively (with only 4% difference respecting to the control cell population) thus, apoptosis induction at IC<sub>50</sub> concentration was not clearly concomitant with the MMP disturbance.

At IC<sub>80</sub> concentration we can observe a changes in Rh123 cell population regarding the untreated control cells, this difference is around 10% in both cell population, this is a good clue that the hydroxyaldehyde induce apoptosis in B16F10 cells at IC<sub>80</sub> concentration, which is perfectly consistent with the apoptosis and cell cycle analysis previously mentioned. This decrease in the percentage of Rh123 positive cells can probably be related with the high cytotoxicity of the compound at this time and concentration, the loss of part of the mitochondrial membrane potential can be a consequence of the secondary activation of the intrinsic apoptotic pathway as final event in the extrinsic apoptosis mechanism exerted by the hydroxyaldehyde **97** apoptosis induction. These findings leads us to suggest that this compound can induce apoptosis extrinsically followed by an intrinsic pathway. Further molecular studies will be necessary to confirm these asseverations.

As previously discussed, our data showed evidence that the products **91** and **97** exerts an anti-proliferative and pro-apoptotic effect on B16F10 cells. To corroborate these results, it can be determined, furtherly whether these two products are capable of inducing the processes and morphological changes characteristic of apoptosis. Among them, it is worth highlighting the condensation of chromatin, DNA fragmentation, the cell volume reduction and caspases activation. Part of these changes can be observed with direct vision of the cell culture through phase contrast microscopy, in which cell fragments and / or apoptotic bodies are clearly visible. Among the techniques the most used to clearly reveal the morphological changes related to the induction of apoptosis is the Hoechst staining, in which the collapse of the nucleus in a dense sphere and the appearance of apoptotic bodies can be observed.

Another test performed for the confirmation of apoptosis is the evaluation of caspase-3 activity, apoptosis can also be confirmed by DNA fragmentation assay.

These tests used for the determination of apoptosis are part of the tests frequently used in this regard, having been used in many of the articles for determining the antiproliferative and pro-apoptotic potential of natural and synthetic compounds. Thus, for example, the

activation of caspase-3 by betulinic acid has been described in M4Beu human melanoma cells <sup>166</sup>. The induction of DNA fragmentation has also been described in response to the action of betulinic acid <sup>167</sup>

---

### ANTIINFLAMMATORY ACTIVITIES

---

Inflammation is a factor that is caused human diseases, with changes in modern lifestyle, such as urbanization and ageing. The inflammation reaction is an organismic expression of self-preservation against pathological infection or injury, which is not only a manifestation but is also an inducement of some diseases, such as autoimmune diseases, cardiovascular diseases and cancer.<sup>168</sup>

Inflammatory responses are mediated by inflammatory cells including macrophages. Activated macrophages produce reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), and cause substantial oxidant injury to surrounding tissue.

Extensive laboratory and clinical evidence indicates that chronic inflammation contributes to cancer. Oxidative stress-induced neuron injury induces a variety of neurodegenerative diseases including Alzheimer's and Parkinson's disease as well as cerebral ischemia.<sup>169</sup>

Although nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids have effective treatment against inflammation, new and safe anti-inflammatory agents are needed to

---

<sup>166</sup> Harmand PO, Duval R, Delage C, Simon A. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int J Cancer*. 2005;114(1):1–11.

<sup>167</sup> a) Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature medicine*. 1995 Oct;1(10):1046-51. b) Raghuvar Gopal D V., Narkar AA, Badrinath Y, Mishra KP, Joshi DS. Betulinic acid induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl. *Toxicol Lett*. 2005;155(3):343–51.

<sup>168</sup> a) Hall CJ, Wicker SM, Chien AT, Tromp A, Lawrence LM, Sun X, et al. Repositioning drugs for inflammatory disease-fishing for new anti-inflammatory agents. *Disease models & mechanisms*. 2014;7(9):1069–81. b) D. Mathis and, Shoelson. SE. Immunometabolism: an emerging frontier Diane. *Physiol Behav*. 2017;176(1):139–48.

<sup>169</sup> a) Oh PS, Lee SJ, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Rhus verniciflua* STOKES inhibits inflammation-related protein and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(1):111–6. b) Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, Kim DH. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(4):652–6. c) Yang JH, Suh SJ, Lu Y, Li X, Lee YK, Chang YC, Na MK, Choi JH, Kim CH, Son JK, Chang HW. Anti-inflammatory activity of ethylacetate fraction of *Cliona celata*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011;33(2):373–9. d) Hofseth LJ, Wargovich MJ. Inflammation, cancer, and targets of ginseng. *J Nutr*. 2007;137(1):183–5. e) Liu Q, Kou JP, Yu BY. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells via inhibiting NF-κB activation. *Neurochem Int*. 2011;58(1):119–25.



prevent sufferers from experiencing unexpected side-effects. The potential anti-inflammatory activity of cassane-type diterpenes from *Caesalpinia* was largely studied, which was usually tested for screening systems of inhibition against nitric oxide (NO), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and other inflammatory mediators, as well as cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), which are preliminarily involved signaling pathways. (See chapter II - section antecedents)

Hence the growing interest in obtaining cassane-type diterpenes and analogues, synthesizing or extracting them by orienting their effects to the prevention and treatment of pathologies related to the inflammation processes, our work is also fitting in this context.

### **1. Induced cytotoxicity of Cassane-type diterpenoids and analogues on in RAW 264.7 monocyte/ macrophage murine cells**

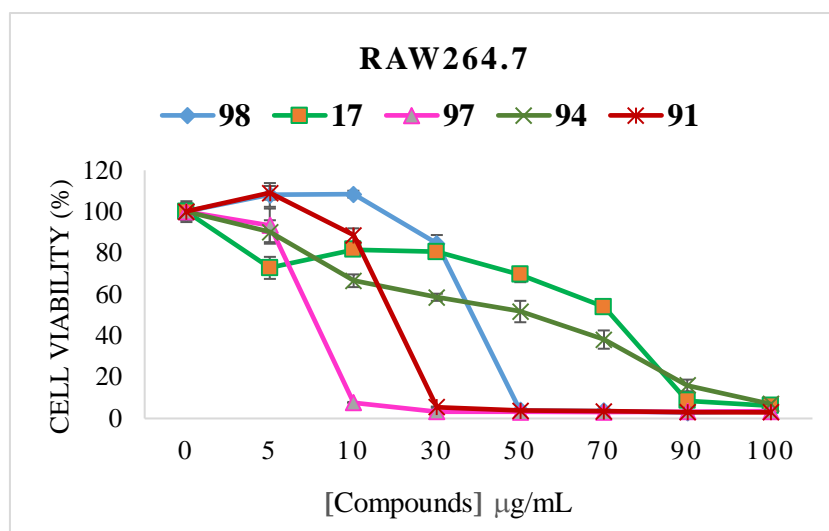
The RAW 264.7 cells are monocyte/macrophage-like cells, originating from Abelson leukemia virus transformed cell line derived from BALB/c mice. These cells are being described as an appropriate model of macrophages. They are capable of performing pinocytosis and phagocytosis. Upon LPS stimulation RAW 264.7 cells increase nitric oxide (NO) production and enhance phagocytosis. Furthermore, these cells are able to kill target cells by antibody dependent cytotoxicity<sup>170</sup>

The popular murine macrophage cell line, RAW 264.7, is often used to initially screen natural products for bioactivity and to predict their potential effect in vivo or on primary cells. The cell line response is considered to reflect the potential human de novo response, and is used to evaluate the effective bioactivity of the product.

Cytotoxicity (cell viability) of the assayed compounds was evaluated on RAW 264.7 murine macrophage cells to establish infracytotoxic concentrations. This is needed to assure that anti-inflammatory effects were due to an inflammatory process and not due to their intrinsic cytotoxicity. The cell viability assay was carried out after 72 hours of treatment. Our results revealed that all the tested products (final molecules and intermediates) have an anti-proliferative effect against RAW 264.7 cells.

---

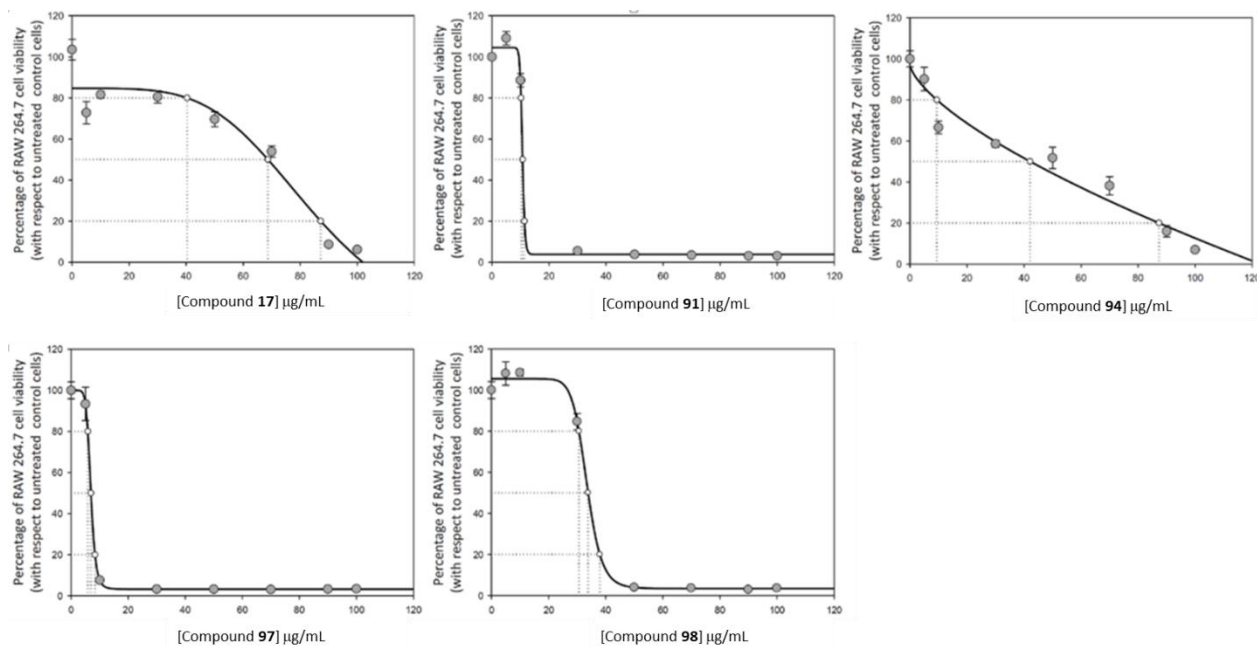
<sup>170</sup> Fuentes AL, Millis L, Vapenik J, Sigola L. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. *J Surg Res.* 2014;189(2):304–12



**Figure 38a.** Variation of cell viability percentage's in RAW 264.7 monocyte/ macrophage murine cells, at increasing concentrations of group I products after 72 h of treatment. Cell growth inhibition was analyzed by the MTT viability assay.

As we can observe from the figure 38, all compounds belonging to the 1<sup>st</sup> group, exhibited an antiproliferative effect and decrease the number of viable RAW 264.7 macrophage-like cells, in dose- dependent manner. Being **97**, **91** and **98** the most cytotoxic ones.

From the previously determined IC<sub>50</sub> values ( results section) we conclude that all the analyzed compounds present a powerful cytotoxic activity against RAW 264.7 cells, highlighting among them eleven compounds **91**, **97**, **104**, **105**, **108**, **110**, **119**, **120**, **122**, **123** and **131** which were strongly cytotoxic against RAW 264.7 cell lineage.



**Figure 38b.** Effect of compounds **17**, **91**, **94**, **97** and **98**, on cell proliferation of RAW 264.7 macrophage murine cells. After treatment with the compounds in the range of concentration from 0 to 100 µg/mL, each point represents the mean value  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate. IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, and IC<sub>80</sub> are the concentrations required for growth inhibition of 20%, 50% and 80%.

## 2. Cassane-type diterpenoids (1st and 2nd group) inhibited Nitric Oxide production

Macrophages exert key functions during the immune response. To perform most of these functions macrophages must be activated<sup>171</sup>. Thus, macrophages are able to kill bacteria, virus or parasites directly; to secrete several immune regulators (TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc.); to process antigens and present them to T cells; and finally, to act as scavenger cells and to participate in tissue remodeling. However, macrophages do not always play a positive role in the homeostasis of the immune system. Under some circumstances, macrophages have deleterious effects. This is the case of the septic shock, which is a severe systemic inflammatory response triggered by the interaction of LPS with macrophages and other host cells<sup>172</sup> Although this interaction leads to the progressive release of a variety of

<sup>171</sup> a) Celada A, Nathan C. Macrophage activation revisited. *Immunol Today*. 1994;15(3):100–2. b) Schreiber RD, Hicks LJ, Celada A, Buchmeier NA, Gray PW. Monoclonal antibodies to murine  $\gamma$ -interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J Immunol*. 1985;134(3):1609–18.

<sup>172</sup> Bone R. Sepsis, the Sepsis Syndrome, Multi-Organ Failure: A Plea for Comparable Definitions The Need to Educate Physician-Scholars for Leadership in the Health Care System. *Ann Intern Med*. 1991;114(4):332–3.

proinflammatory cytokines such as IL-8, IL-1b, and IL-6<sup>173</sup>, experimental evidence points to nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF), as the primary mediators of the changes observed during septic shock<sup>174</sup>. Central to the pathogenesis of the endotoxic shock is the development of circulatory failure, characterized by hypotension, myocardial dysfunction and tissue hypoxia that ultimately leads to multiorgan failure and death<sup>175</sup>. The endotoxic shock produced by LPS is characterized by a systemic inflammation, multi-organ injury, circulatory collapse and death. The damaging effect of LPS during septic shock has been associated, mainly, to the production of nitric oxide (NO) and the secretion of TNF- $\alpha$ . Both harmful agents are produced and secreted mainly by tissue macrophages activated by LPS, so this cell type plays a key role in the development of endotoxic shock.

In this work we have studied the inhibitory action of our synthesized cassane-type diterpenes (1st and 2<sup>nd</sup> groups) on the NO production caused by the LPS using as Cell model RAW 264.7 monocyte/ macrophage-like cells. The anti-inflammatory activity of the compounds was analysed by measuring the nitrite concentration (which is proportional to the released NO) in the cell culture medium by the Griess method. Macrophages were activated with LPS during 24 h after the addition of the compounds. Sub-cytotoxic concentrations corresponding to  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, and  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> were used. As we have seen in the result chapter, all the tested compounds (1st and 2nd group) inhibited moderately to strongly the production of nitrites, with inhibition rates ranging from 11.06 % to 100 % at sub-cytotoxic concentrations  $\frac{3}{4}$  IC<sub>50</sub> after only 72h of treatment.

Overall, our results on the production of inflammatory mediators, NO production, are consistent with the earlier findings of Thailand researchers **Yodsaoue** and his colleagues, they discovered that taepeenins L and D from *C. mimosoides* exhibited the NO inhibitory activity, with IC<sub>50</sub> values of 7.1 and 8.2  $\mu$ M, respectively.<sup>20</sup>

The NO inhibition effect of the cassane-type diterpenoids from the roots of *C. pulcherrima* was first reported by the same scholars in the following year, and the results

---

<sup>173</sup> Salkowski CA, Neta R, Wynn TA, Strassmann G, Van Rooijen N, Vogel SN. Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression and radioprotection. *J Immunol.* 1995;155(6):3168–31679.

<sup>174</sup> a) Parrillo JE. Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. *N Engl J Med.* 1993;328:1993; 328:1471-1477. b) Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet.* 1991;338(8782–8783):1557–8

<sup>175</sup> M M Parker I, J H Shelhamer, C Natanson, D W Alling JEP. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med.* 1987;15(10):923-9.

indicated that pulcherrin Q possessed the most potent NO inhibitory properties, with an  $IC_{50}$  value of 2.9  $\mu$ M, followed by pulcherrins K, L, N-P, isovouacapenol C , 6 $\beta$ -cinnamoyl-7 $\beta$ -hydroxy-vouacapen-5 $\alpha$ -ol, pulcherrimins A, B, C, E and 8,9,11,14-didehydrovouacapen- 5 $\alpha$ -ol (166), which significantly reduced the production of NO, with  $IC_{50}$  values between 3.4 and 10.2  $\mu$ M, better than did indomethacin ( $IC_{50}$  14.5  $\mu$ M, a positive control).<sup>130</sup>

Time	Sample	$\frac{3}{4} IC_{50}$	$\frac{1}{2} IC_{50}$	$\frac{1}{4} IC_{50}$
48h	C -		0,00 $\pm$ 1.37	
	C +		100,00 $\pm$ 7.47	
	17	11,67	22,19 $\pm$ 0.64	77,11 $\pm$ 1.29
	91	14,87 $\pm$ 1.29	40,04 $\pm$ 0.64	90,38 $\pm$ 3.23
	94	10,29 $\pm$ 1.29	13,50 $\pm$ 1.94	40,04 $\pm$ 0.64
	97	24,02 $\pm$ 1.29	40,04 $\pm$ 0.64	86,72 $\pm$ 8.41
	98	13,04 $\pm$ 0.00	29,06 $\pm$ 0.64	57,89 $\pm$ 1.29
	72h	C -		0,00 $\pm$ 1.51
C+			100,00 $\pm$ 4.47	
17		2,00 $\pm$ 0.40	23,54 $\pm$ 0.50	84,07 $\pm$ 0.10
91		19,67 $\pm$ 0.30	62,32 $\pm$ 1.31	104,04 $\pm$ 3.03
94		0,42 $\pm$ 0.40	11,73 $\pm$ 0.81	49,30 $\pm$ 0.30
97		8,80 $\pm$ 0.50	41,57 $\pm$ 1.31	112,20 $\pm$ 3.44
98		3,79 $\pm$ 0.30	38,71 $\pm$ 0.10	79,64 $\pm$ 0.70

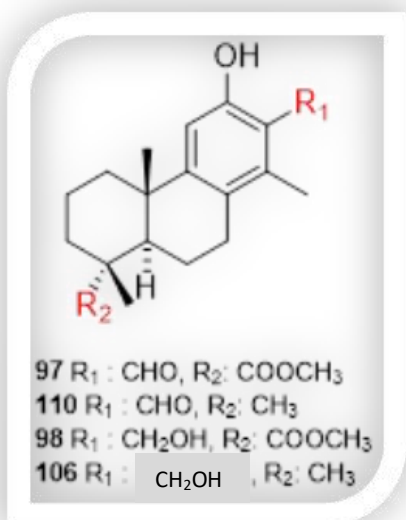
**Table 24.** Percentages of Nitrates production in LPS activated RAW 264.7 macrophage murine cells at  $\frac{1}{4}IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}IC_{50}$  and  $\frac{3}{4}IC_{50}$  concentrations, after 48 and 72 h of treatment with compounds of **Group I**. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.

Time	Sample	$\frac{3}{4}$ IC <sub>50</sub>	$\frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub>	$\frac{1}{4}$ IC <sub>50</sub>
48h	C-	0,000		
	C+	100,000		
	16	4.80 ± 3.88	8.00 ± 3.23	61.55 ± 2.58
	101	18.99 ± 1.94	22.19 ± 1.29	73.91 ± 0.64
	102	0 ± 0.64	0 ± 0.64	7.55 ± 1.29
	103	8,00 ± 1.94	16.6 ± 0.1	23.56 ± 1.94
	104	67,04 ± 1.29	72.08 ± 0.64	104.11 ± 1.94
	105	56,97 ± 0.1	85.81 ± 0.1	94.05 ± 0.1
	106	42,33 ± 0.1	38.21 ± 0.64	77.11 ± 0.1
	107	18,07 ± 0.1	34.09 ± 0.1	81.23 ± 0.64
	108	7,09 ± 0.64	16.24 ± 0.64	45.53 ± 0.64
	109	16,24 ± 0.64	21.73 ± 0.64	65.21 ± 3.88
110	13,50 ± 1.94	30.43 ± 2.58	66.13 ± 0.1	
72h	C-	0.00		
	C+	100.00		
	16	0.00 ± 0.30	16.17 ± 1.21	90.80 ± 0.30
	101	22.25 ± 2.73	40.64 ± 0.00	97.10 ± 0.70
	102	0.00 ± 0.20	0.00 ± 0.20	3.22 ± 0.10
	103	0.50 ± 0.30	0.71 ± 0.40	24.90 ± 0.20
	104	88.94 ± 0.10	90.94 ± 0.10	101.03 ± 1.41
	105	69.48 ± 0.10	95.67 ± 0.30	103.04 ± 1.01
	106	8.87 ± 0.20	24.61 ± 1.21	84.29 ± 1.21
	107	27.26 ± 0.91	64.25 ± 0.40	112.05 ± 1.82
	108	4.36 ± 0.30	27.90 ± 0.60	84.65 ± 2.93
	109	2.29 ± 0.20	27.47 ± 1.21	95.59 ± 0.40
110	1.28 ± 0.20	18.53 ± 0.70	77.78 ± 131	

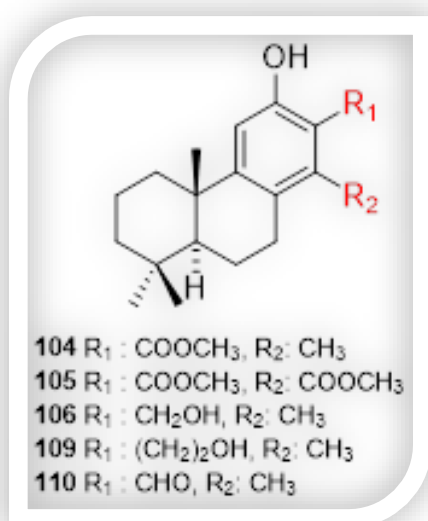
**Table 25.** Percentages of Nitrates production in LPS activated RAW 264.7 macrophage murine cells at  $\frac{1}{4}$ IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$ IC<sub>50</sub> and  $\frac{3}{4}$ IC<sub>50</sub> concentrations, after 48 and 72 h of treatment with compounds of **Group II**. The data represent the mean ± S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.

From the results chapter findings data and tables (24-25), we can conclude the following preliminary SAR analysis for the anti-inflammatory activities according to the inhibitory activity on NO (nitrites) production.

### TRICYCLIC CASSANE DITERPENOIDS

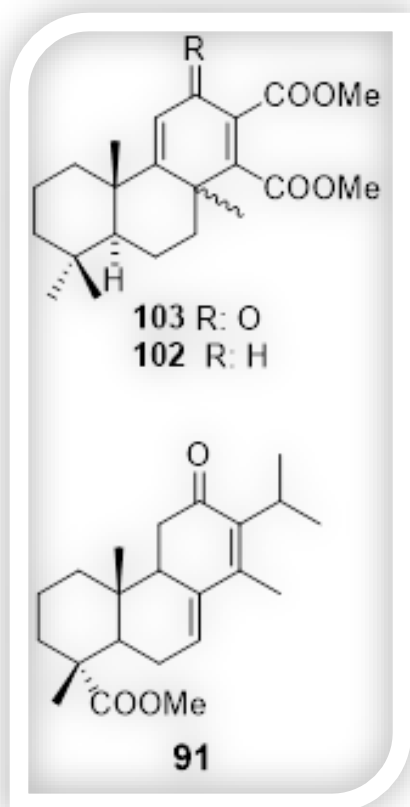


◆ The **C-18** position (**COOMe** Versus **CH<sub>3</sub>** substitution), the COOMe group at C18 position in the hydroxyaldehyde, diminish the anti-inflammatory effect in the LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell. (**97 Vs 110**). However, in the diol, the presence of ester group enhanced the anti-inflammatory activity (**98 Vs 106**)



◆ The **C-14** position (**Ester** versus **Methyl** substitution): the carboxymethyl group might play an important role in enhancing the anti-inflammatory potential of hydroxyester in the LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. (**104 Vs 106**),

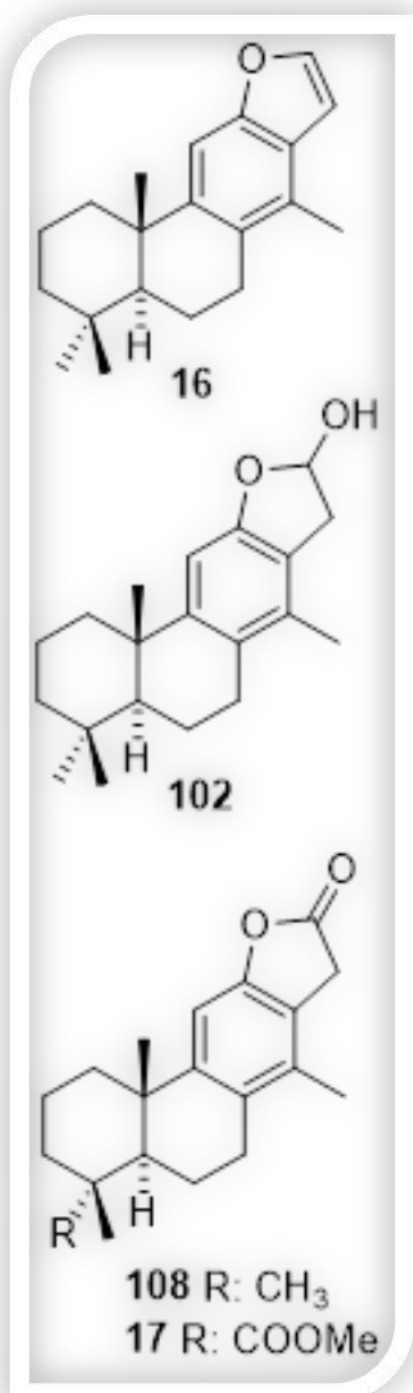
◆ The **C-13** position: the impact of C13 substitution on the inhibitory effect was in the following order: COOMe > C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH > CH<sub>2</sub>OH > CHO. The ester group appear to have the greatest effect on the anti-inflammatory activity of tricyclic cassane-type diterpenoids with aromatic C ring. (**104 and 105 Vs 106 Vs 109 Vs 110**)



♦ The **C-12** position: In general terms, it can be conjectured that the  **$\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety** is required for the anti-inflammatory effect of the tricyclic cassane diterpenes, however the oxidation at C-12 of **103** resulted in 8-fold decrease in activity against NO production compared to that of **102**. (**102 Vs 103 Vs 91**)



## TETRACYCLIC CASSANE DITERPENOIDS



◆ **Lactol, lactone and furan cassane diterpenoids**

**D ring:** The most potent anti-inflammatory tetracyclic cassane framework was the furan D ring followed by the lactol and finally the butanolide lactone in LPS induced RAW264.7 cell line.

◆ The **C-18** position (COOMe Versus CH<sub>3</sub> substitution), the COOMe group increased significantly the NO inhibition in LPS- treated RAW macrophages. (Lactone **17** was 14 times more potent than lactone **108**)

### 3. Dienone **91** and Hydroxyaldehyde **97** reverted the RAW624.7 cell cycle arrest induced by LPS.

Bacterial lipopolysaccharide (LPS) activates macrophages, leads to production of inflammatory mediators, and causes cell damage and death. In fact, LPS exhibits a cytotoxic action on various types of cells via apoptosis<sup>176</sup>. LPS can also stimulate inflammatory reaction and caused G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase arrest in the RAW cell cycle.

Of note, according to the content of DNA in cells, which can regulate the cell growth and replication, the cell cycle can be divided into three phases: G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M.

In the present study, after determining the immune response enhancement of the synthesized cassane-type diterpenes in the NO production of LPS-stimulated RAW264.7 macrophages, we investigated and performed the cell cycle phase distribution analysis of LPS-activated macrophages using flow cytometry, to gain insights into this issue and to further clarify whether these diterpenes could revert or suppress the LPS induced damage (arrest) on the RAW264.7 cell cycle.

We confirmed that non-toxic doses of compounds **91** and **97** modulate inflammatory responses of LPS- activated RAW 264.7 macrophages.

Compounds **91** and **97**, dose-dependently reverted LPS induced G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest, these variations were more significant at higher concentrations (still non-toxic concentrations) of both products, and tended to diminish over shorter incubation periods.

Dienone **91** caused dramatically the inhibition of LPS-activated macrophages differentiation, increasing the S phase cell population (65.74%, 66.94%, and 67.81 %) with concomitant decrease in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>/M cell number at all test concentrations.

Hydroxyaldehyde **97** hampered in turn the complete macrophages cell cycle arrest induced by LPS action, decreasing the cell number in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, with respect to positive control (56.24%, 66.03%, and 81.98%) at all tested concentrations (sub-cytotoxic).

This cell cycle modulation might be attributable to the anti-inflammatory effects of the two studied cassane diterpenes.

---

<sup>176</sup> a) Zhang YH, Takahashi K, Jiang GZ, Kawai M, Fukada M, Yokochi T. In vivo induction of apoptosis (programmed cell death) in mouse thymus by administration of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1993;61(12):5044–8. b) Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards III CK, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med.* 1997;186(11):1831–41. c) Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, Tamada Y, Yokochi T. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun.* 1996;64(3):734–8. D) Koide N, Abe K, Narita K, Kato Y, Sugiyama T, Jiang GZ, Yokochi T. Apoptotic cell death of vascular endothelial cells and renal tubular cells in the generalized Shwartzman reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996;16(3–4):205–11.

Compound	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	G0/G1	S	G2/M
<b>91</b>	C-	51,65 $\pm$ 0.75	48,26 $\pm$ 0.66	0,07 $\pm$ 0.13
	C+	100,00 $\pm$ 3.34	0,00 $\pm$ 3.34	0,00 $\pm$ 3.34
	1/4 $\cdot$ IC <sub>50</sub>	25,88 $\pm$ 5.93	65,74 $\pm$ 5.47	8,37 $\pm$ 0.50
	1/2 $\cdot$ IC <sub>50</sub>	28,92 $\pm$ 1.85	66,94 $\pm$ 1.09	4,13 $\pm$ 1.13
	3/4 $\cdot$ IC <sub>50</sub>	32,06 $\pm$ 2.65	67,81 $\pm$ 2.47	0,67 $\pm$ 0.96
<b>97</b>	1/4 $\cdot$ IC <sub>50</sub>	56,24 $\pm$ 2.19	39,70 $\pm$ 1.62	4,05 $\pm$ 2.87
	1/2 $\cdot$ IC <sub>50</sub>	66,03 $\pm$ 3.64	25,41 $\pm$ 4.37	9,70 $\pm$ 2.04
	3/4 $\cdot$ IC <sub>50</sub>	81,98 $\pm$ 4.51	17,48 $\pm$ 4.66	0,53 $\pm$ 0.21

**Table 26.** Percentage of RAW264.7 macrophage murine cells in the different phases of the cell cycle, G0/G1, S and G2/M, in response to treatment with **91** and **97** for 72 h, at its  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> and  $\frac{3}{4}$ IC<sub>50</sub> concentrations. Results obtained for negative control (untreated cells) and positive control (cells only treated with LPS) are showed. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least two independent experiments performed in triplicate.

According to the literature, up until now, no study has been carried out regarding the study of cassane type diterpenes potential on the change and anti-inflammatory modulation in the RAW624.7 cell cycle arrest induced by lipopolysaccharide LPS.

Finally, it should be noted that the anti-inflammatory effect of all synthesized cassane diterpenes analogues (14-desmethyl and bicyclic or tricyclic analogues) in this work, are currently underway in our laboratories.

The synthesis and evaluation of a series and related cassane diterpenoids analogues has led to the enrichment of available structure–activity relationships for the antitumor and anti-inflammation activities and has led to the identification of a key step molecules such as hydroxyaldehyde **91** and dienone **97** as new lead compounds. Studies aimed to further improve their inhibitory potency as well as to pinpoint their molecular target are planned and their results will be reported in due course.

In Previous reports have been showed the anti-inflammatory potential of natural diterpenes compounds. In natural form occurred cassane diterpenoids from *Caesalpinia*, *C. mimosoides*, *C. echinata*, *C. minax* and from the roots of *C. pulcherrima*. The anti-inflammmtory potential of these compounds was tested from inhibition against nitric oxide (NO), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and other inflammatory mediators, as well

as cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteins involved in the inflammatory signaling pathways.

The NO release inhibition exerted by cassane diterpenoids isolated from the roots of *C. pulcherrima* was reported for the first time by the Yodsaoue et al in 2011, they have demonstrated that pulcherrin Q possessed potent NO inhibitory properties, with an IC<sub>50</sub> value of 2.9  $\mu$ M<sup>20, 177</sup>, Moreover, the Japanese scholars Lin et al., have confirmed that caesalmin A, caesalpinins D and H extracted from the seeds of *C. minax* displayed a moderate NO inhibitory effect, with IC<sub>50</sub> values between 25.40  $\mu$ M<sup>178</sup>

Regarding to the COX-2 inhibitory effect, subsequent investigations realized by the scholars Zhang et al., between 2014 and 2015, led to the separation of 24 new Cassane diterpenoids from *C. minax*. As result, Bonducellpin D, caesalmin A and caesalpinimin A, exhibited the COX-2 inhibitory effect with IC<sub>50</sub> values of 2.4, 3.2 and 4  $\mu$ M, respectively. Furthermore, bonducellpin D displayed the highest inhibitory effect, with 82% inhibition at 4  $\mu$ M.<sup>179</sup>

Concerning the NF- $\kappa$ B cassane diterpenoids inhibition effect, Mitsui and his colleagues in 2014 and 2015, demonstrated that two of 21 new cassane diterpenoids isolated from the stems of *C. echinata*, exhibited NF- $\kappa$ B inhibition effect: echinalides C (5  $\mu$ M: 70% inhibition) and D (5 $\mu$ M: 78% inhibition) showed potent activities that are nearly equivalent to a known potent NF- $\kappa$ B inhibitor, parthenolide (5  $\mu$ M: 98% inhibition).<sup>180</sup>

---

<sup>177</sup> Yodsaoue O, Karalai C, Ponglimanont C, Tewtrakul S. Pulcherrins D e R , potential anti-in fl ammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Tetrahedron* . 2011;67(36):6838–46.

<sup>178</sup> a) Liu Q, Bai B, Yang D, Peng S, Zhu L, Luo M. Three new cassane diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. *Nat Prod Res* . 2018;6419:1–7. b) Dong R, Yuan J, Wu S, Huang J, Xu X, Wu Z, Gao H. Anti-inflammation furanoditerpenoids from *Caesalpinia minax* Hance. *Phytochemistry* . 2015;117:325–31.

<sup>179</sup> a) Zhang JL, Tian HY, Chen NH, Bai XY, Li J, Zhang RR, Wu RB, Jiang RW. Caesalpinimin A, a novel rearranged furanoditerpene with an unprecedented carbon skeleton from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. *RSC Adv*. 2014;4(15):7440–3. b) Zhang JL, Chen ZH, Xu J, Li J, Tan YF, Zhou JH, Ye WC, Tian HY, Jiang RW. New structures, chemotaxonomic significance and COX-2 inhibitory activities of cassane-type diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia minax*. *RSC Adv*. 2015;5(93):76567–74.

<sup>180</sup> a) Mitsui T, Ishihara R, Hayashi KI, Sunadome M, Matsuura N, Nozaki H. New cassane-type diterpenoids of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) exhibiting NF- $\kappa$ B inhibitory activities. *Chem Pharm Bull*. 2014;62(3):267–73. b) Mitsui T, Ishihara R, Hayashi KI, Matsuura N, Akashi H, Nozaki H. Cassane-type diterpenoids from *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) and their NF- $\kappa$ B signaling inhibition activities. *Phytochemistry* . 2015;116(1):349–58.

Otherwise, fourteen cassane diterpenoids, particularly caesalpinin M2, found in *C. minax* showed potent inhibitory activity on IL-1 $\beta$  and IL-6, which were identified as targets for the anti-inflammation agent.<sup>181</sup>

Taken together, the above findings indicate that our synthesized (group I and II) and tested compounds showed an important anti-inflammatory effect, and could be used as anti-inflammatory drugs against inflammatory process, further studies will be necessary to asseverate this point. The structural modifications of this active compounds could be a promising strategies to drive new anti-inflammatory drug discovery.

---

<sup>181</sup> a) Tong Z, Cheng L, Song J, Wang M, Yuan J, Li X, Gao H, Wu Z. Therapeutic effects of Caesalpinia minax Hance on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis and the anti-inflammatory activity of cassane diterpenes as main active components. *J Ethnopharmacol* . 2018;226(February):90–6. b) Xiang G, Fan M, Ma Y, Wang M, Gao J, Chen J, Li X, Xue W, Wang Y, Gao H, Shen Y Anti-inflammatory actions of Caesalpinin M2 in experimental colitis as a selective glucocorticoid receptor modulator. *Biochem Pharmacol*. 2018;150(February):150–9.



# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes que se pueden extraer de los resultados expuestos en esta memoria son:

1) Se ha desarrollado una estrategia exitosa hacia la síntesis de taepenina F (**17**) a partir del (-)-ácido abiético (**50**). Se ha comprobado que la introducción del grupo metilo en C-14 no resulta fácil. Tras ensayar la reacción sobre diferentes intermedios, elaborados a partir del ácido abiético (**50**), se ha encontrado que la dienona **88** es el intermedio más apropiado para este objetivo. Los resultados obtenidos en este apartado abren grandes posibilidades para la síntesis de la taepenina D (**15**), siendo el cassano más atractivo para la realización de los oportunos estudios biológicos y conseguir así los resultados que arrojaran datos inequívocos sobre la importancia o no del grupo metilo en el C-14 de estos metabolitos.

2) Se ha llevado a cabo la primera síntesis de (5 $\alpha$ )-vouacapano-8(14),9(11)-dieno (**16**), a partir de (+)-esclareolida (**99**), sin uso de grupos protectores, y con la máxima economía de átomos. Este eficiente trabajo, abre grandes posibilidades para la obtención de otros cassanos relacionados, ya que se ha comprobado en la síntesis de análogos tricíclicos, que la secuencia podría ser aplicada a cualquier dieno análogo al dieno **100**.

3) Los resultados de investigación obtenidos sobre los cassanos naturales, han servido para la obtención de nuevo 14-desmetil análogos de tipo cassano, que permitirán, sin lugar a duda, avanzar en el estudio de la relación estructura -actividad de estos compuestos.

4) Se ha conseguido, por primera vez, sintetizar análogos simples de cassanos a partir de  $\beta$ -ciclocitral (**124**). Los resultados de este trabajo abren grandes posibilidades para encontrar moléculas fácilmente elaborables con potente actividad biológica. Lo que permitiría encontrar posibles aplicaciones de los cassanos en el campo de la biomedicina.

5) Veintiocho productos de las diferentes secuencias de síntesis descritas en esta memoria, han sido evaluados para conocer sus potenciales antiproliferativos “*in vitro screening*” frente a diferentes líneas de células tumorales (HT-29, HepG2 y B16F10) y frente a macrófagos/monocitos murinos RAW 264.7.

6) El efecto antiproliferativo frente a las líneas tumorales, fue inducido por los compuestos pertenecientes a las diferentes vías sintéticas: **91** y **97** con  $IC_{50} < 12 \mu\text{g/mL}$ ,



**16, 103, 104, 105, 106, 108 y 110** con  $IC_{50} < 13.96 \mu\text{g/mL}$ , **119, 120, 122 y 123** con  $IC_{50} < 11.01 \mu\text{g/mL}$  y finalmente el análogo monoterpénico **131** con  $IC_{50} = 3.84 \mu\text{g/mL}$

7) El efecto antiproliferativo frente a macrófagos/monocitos murinos RAW 264.7, fue inducido por los compuestos: **91, 97, 104, 105, 108, 110, 119, 120, 122, 123, 131** con  $IC_{50} < 14.99 \mu\text{g/mL}$

8) Se ha logrado hacer un análisis inicial de la relación estructura-actividad (SAR) entre los diterpenos tipo cassano sintetizados y sus 14-desmetil análogos y sus análogos más simples obtenidos a partir del  $\beta$ -ciclocitral (**124**)

9) Se ha podido deducir que la presencia del grupo metilo en la posición C-14 de los diterpenos tipo casano, es relativamente importante para su efecto citotóxico frente a las líneas celulares utilizadas, incluso puede conducir a una subida moderada de actividad en algunas moléculas de esta familia. (Hidroxialdehído **110** frente a las células de cáncer de colon HT29).

10) De la misma manera, los análisis SAR han confirmado que la parte hidrofóbica de los diterpenos tipo cassano, tiene un impacto sobre sus actividades citotóxicas frente a las líneas celulares ensayadas. Así, los dos análogos simples de cassano **131 y 132** ( $PM < 230 \text{ g / mol}$ ), fueron activos y más potentes que sus correspondientes cassanos diterpénicos **106 y 107**, facilitando su biodisponibilidad y convirtiéndolos a moléculas candidatas a actuar como fármacos.

11) Los dos productos **91 y 97** produjeron efecto antiproliferativo en las células B16F10., a través de procesos de apoptosis celular implicando una detención significativa del ciclo celular mediante el bloqueo de la fase G0 / G1, determinada por la tinción celular con anexina V-FICT y yoduro de propidio por citometría de flujo. Los resultados del MMP sugieren la activación de la vía apoptótica extrínseca para la dienona **97** mientras que la vía apoptótica implicada en el efecto citotóxico del hidroxialdehído **91** podría ser extrínseca seguida con la activación secundaria de la vía apoptótica intrínseca como evento final en el mecanismo de apoptosis inducida por este compuesto.

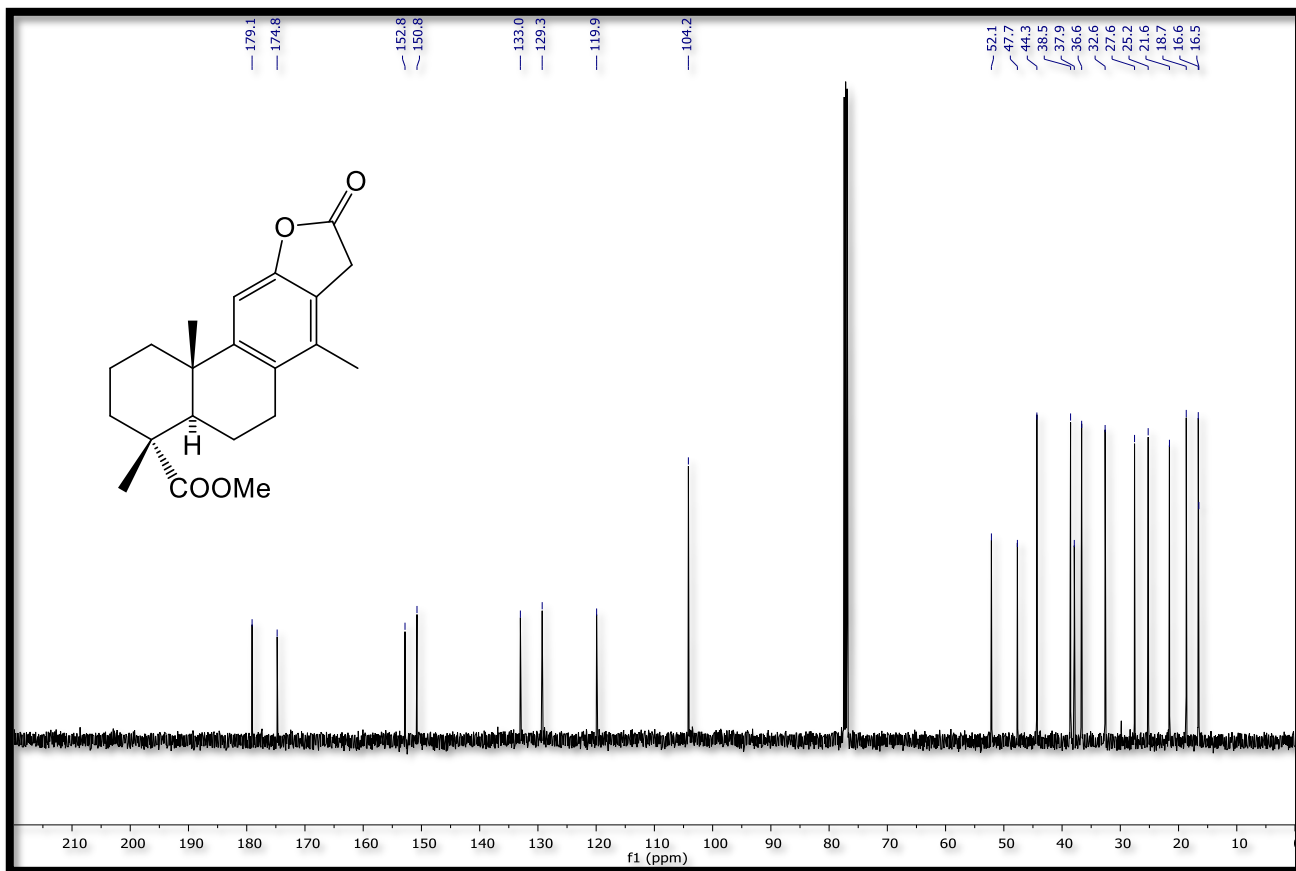
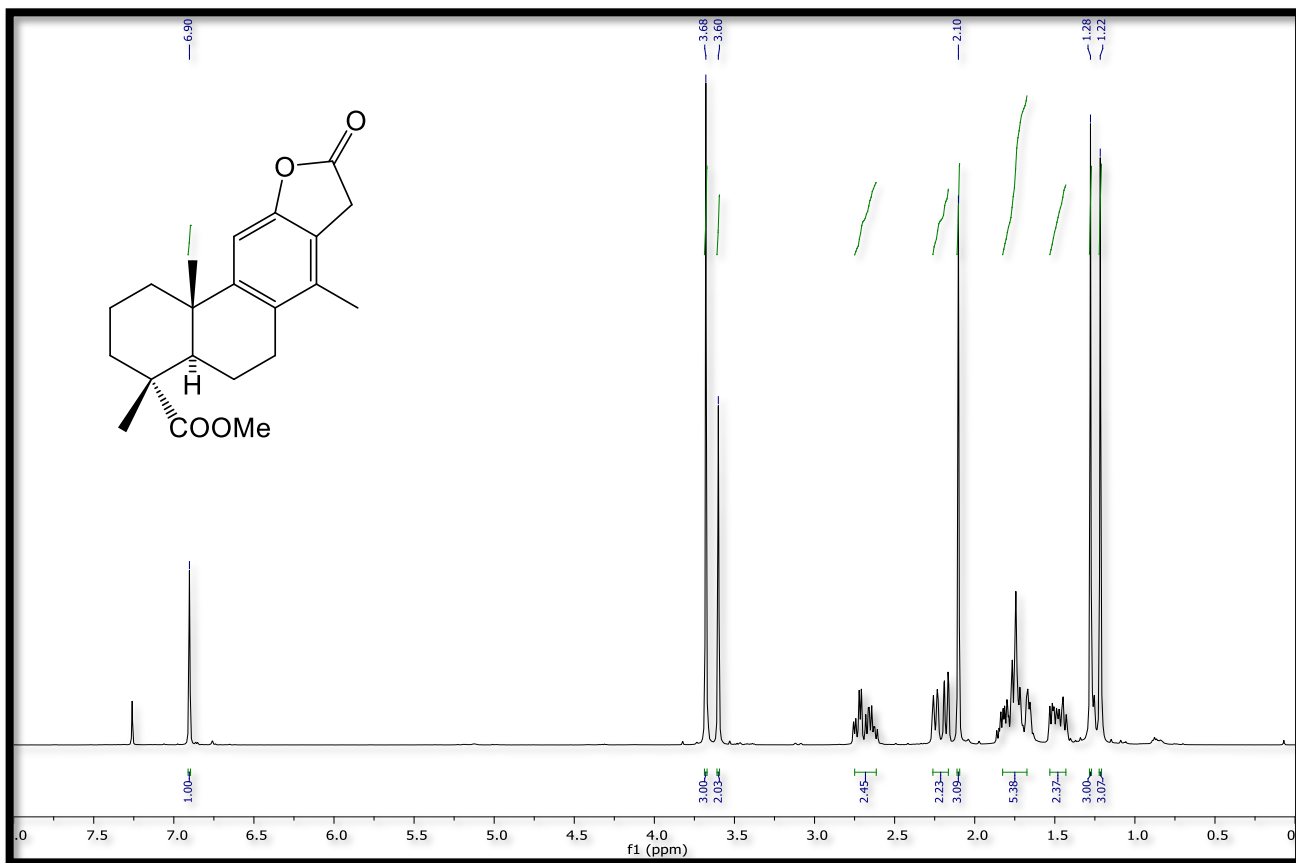
12) Se ha mostrado excitosamente que todos los compuestos del primer y el segundo grupo, exhibieron una inhibición muy importante de la liberación del NO en los macrófagos RAW 264.7, activados con LPS ( un porcentaje llegando hasta el 100% de la inhibición de la secreción del NO, a las 72 horas con concentraciones sub-citotoxicas).

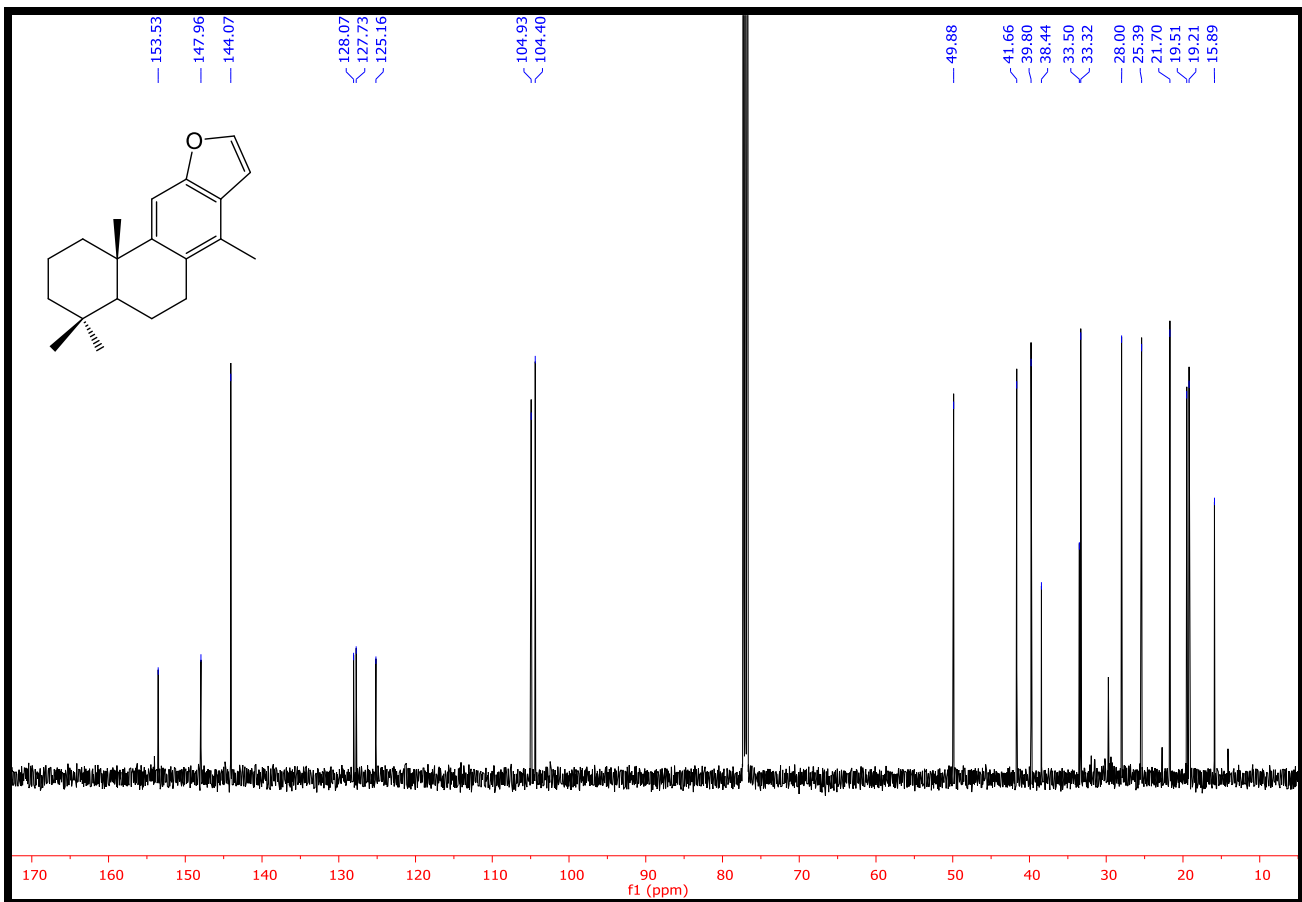
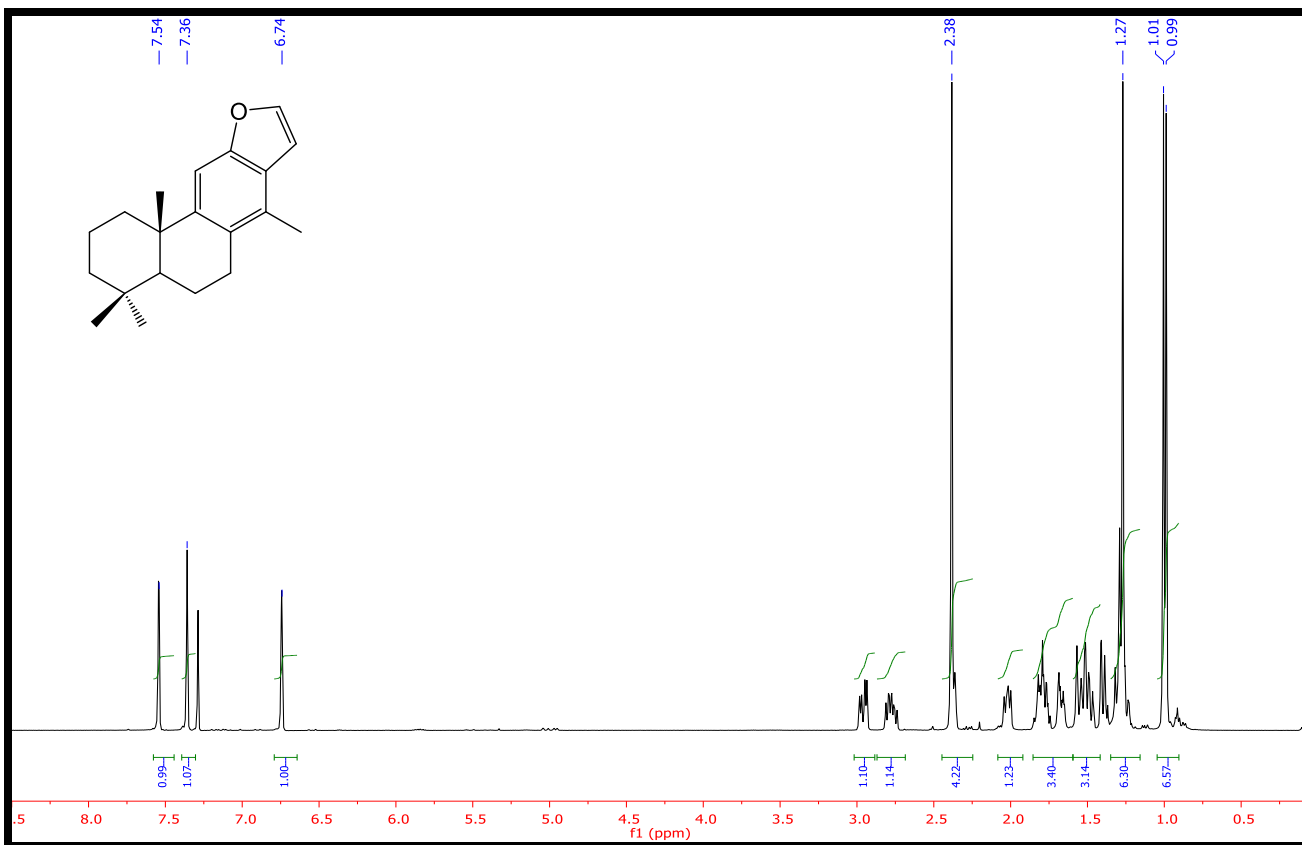
13) El análisis de la distribución del ciclo celular realizada con citometría de flujo, mostró que los compuestos **91 y 97** fueron capaces de revertir la detención del ciclo celular en los macrófagos RAW264.7, inducida. por LPS. La dienona **91** inhibió la diferenciación

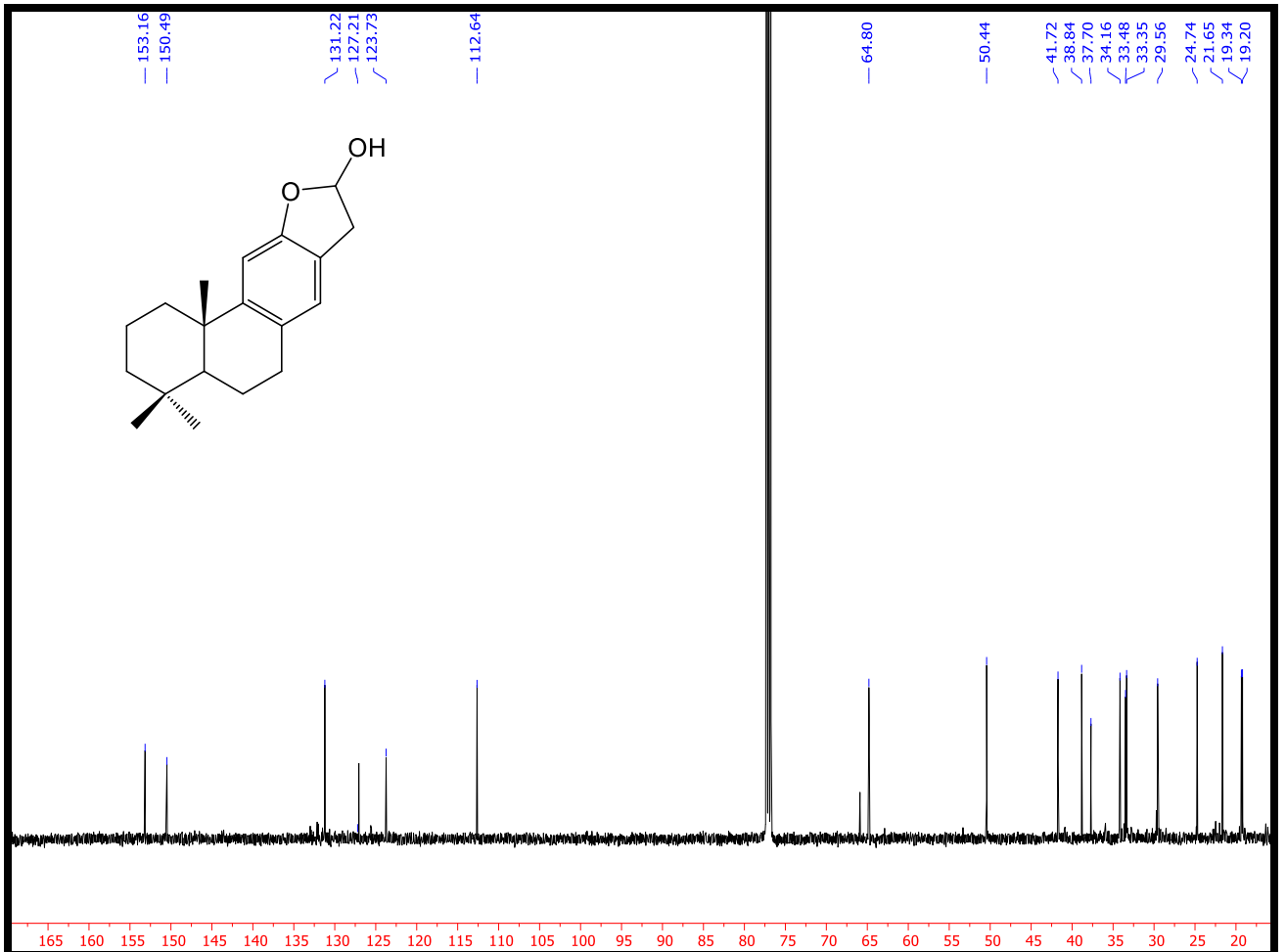
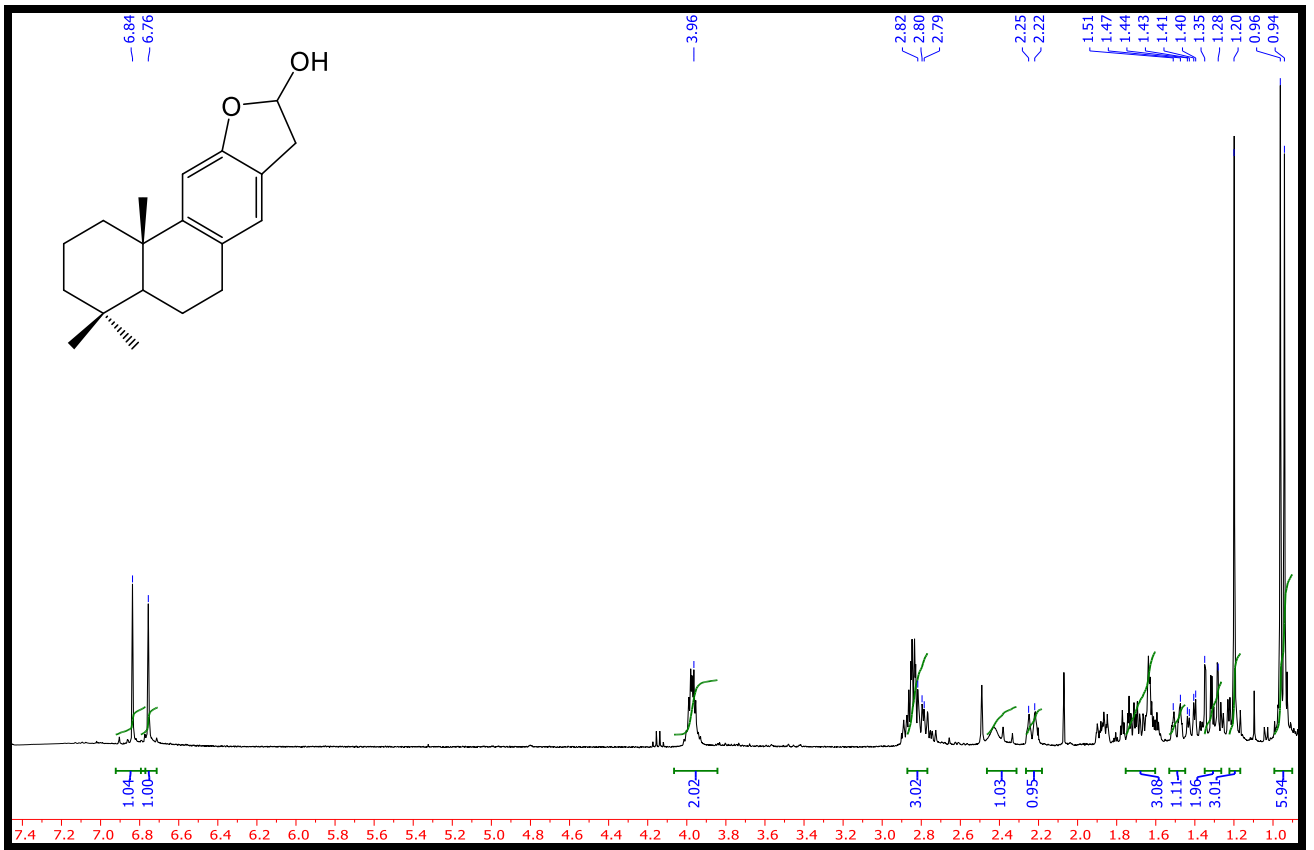
inducida por el LPS en los macrófagos RAW 264.7 aumentando la proporción de células en la fase S y disminuyendo el número de células en las fases G0 / G1 y G2 / M. recuperando así el ciclo celular de los macrófagos. En cuanto al hidroxialdehído **97**, también tuvo efectos sobre el ciclo celular de los macrófagos activados RAW 264.7 recuperándolos de la detención total de G0 / G1 producida en respuesta a la acción del LPS, aumentando la proporción de células en fase G0 / G1 y disminución del número de células en la fase S y las fases G2 / M.

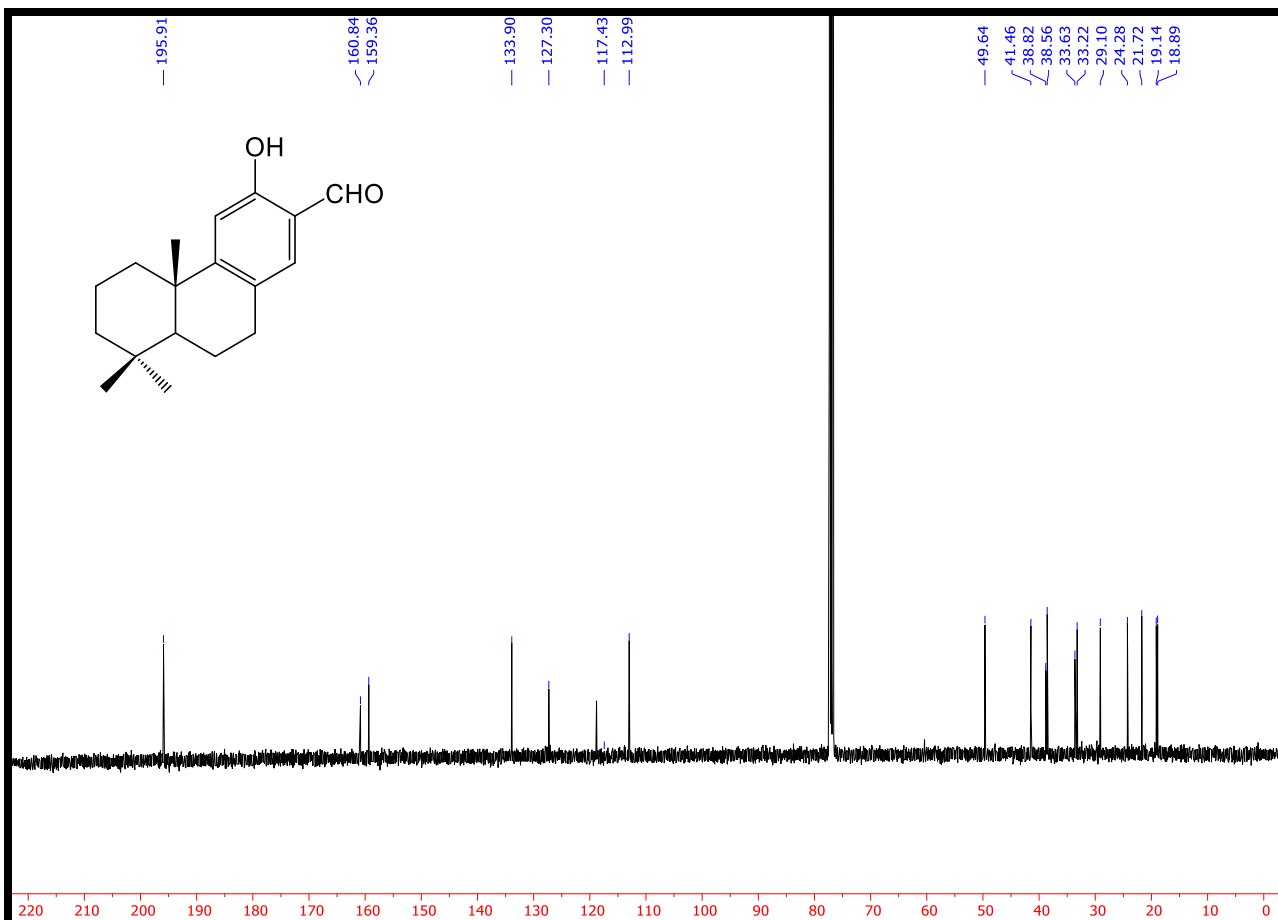
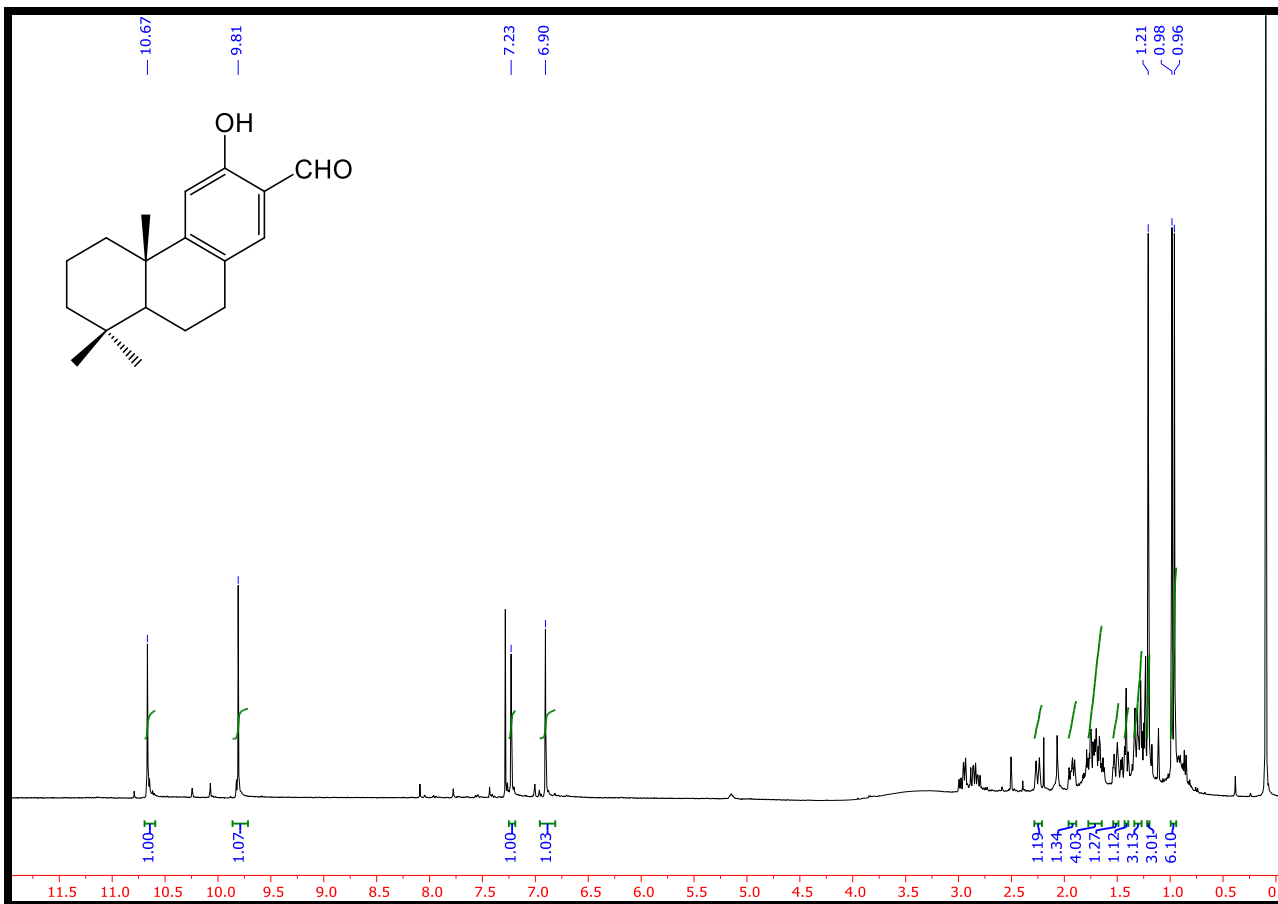
14) Los resultados del presente trabajo indican que los compuestos **91** y **97** podrían ser útiles como agentes antitumorales y antiinflamatorios. Se requieren más estudios para dilucidar los elementos celulares y moleculares implicados en sus efectos, y la actividad/toxicidad en modelos preclínicos.

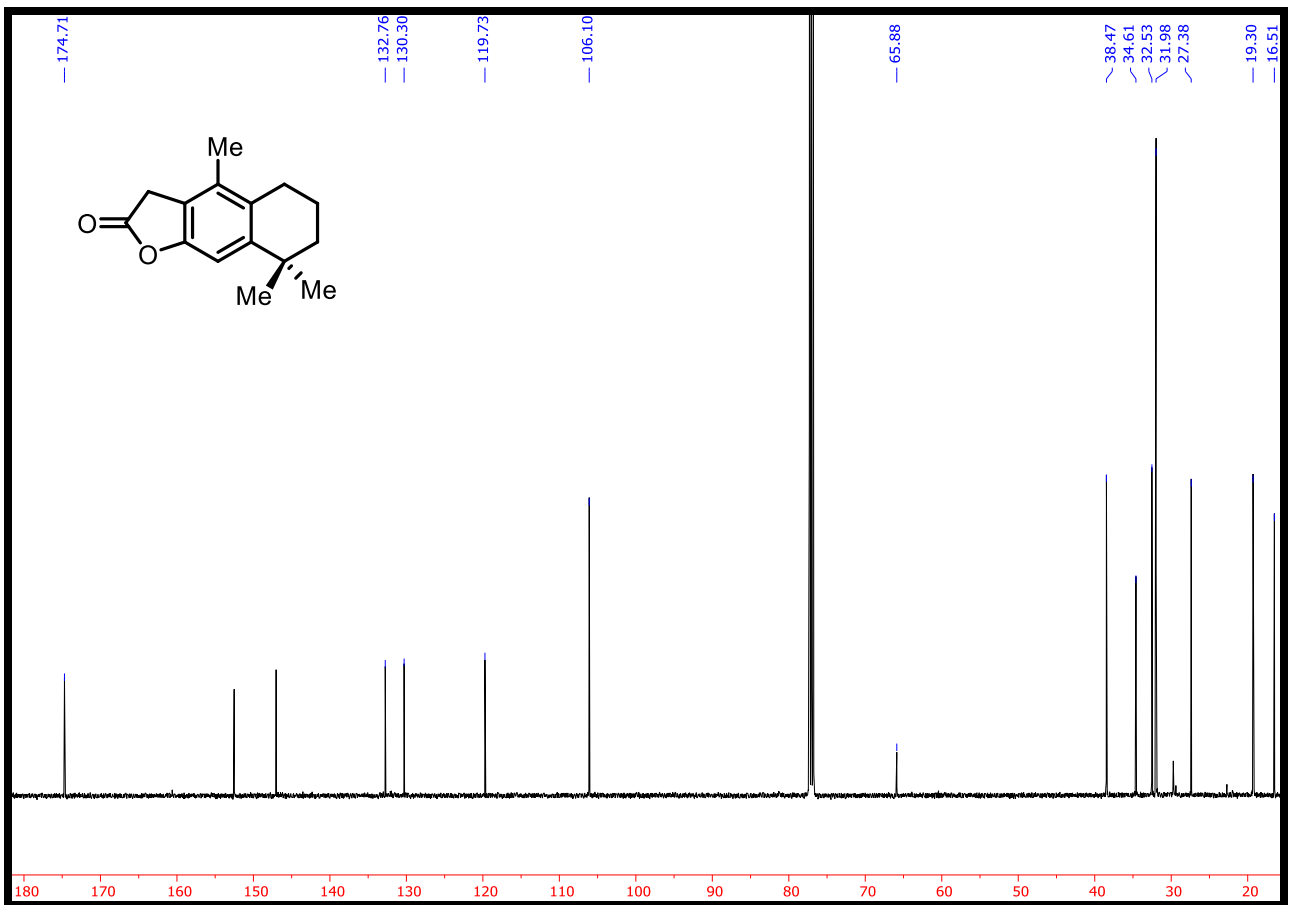
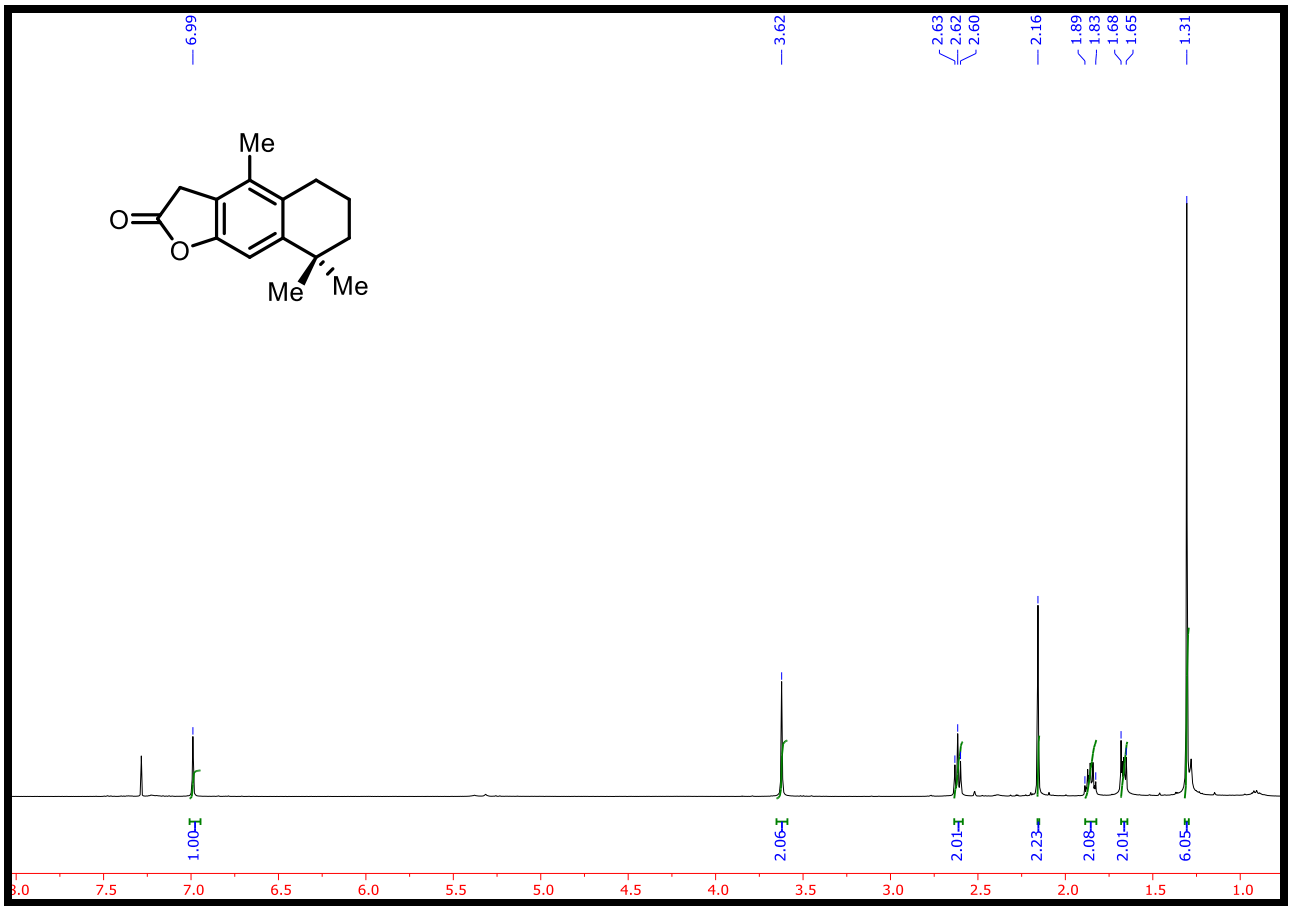
# ESPECTROS

















UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

# TESIS DOCTORAL

## TESIS DOCTORAL