

Exploración de la flora de la Costa Caribe Colombiana en la búsqueda de principios activos potencialmente útiles como antitumorales

Exploration of the Colombian Caribbean flora searching active substances with potential use as antitumor agents

Daneiva del Carmen Caro Fuentes
Candidato



Universidad
de Cartagena
Fundada en 1827

Luis Alberto Franco Ospina Ph.D.
Director



Noviembre de 2021



Universidad
de Cartagena
Fundada en 1827

***Exploración de la flora de la
Costa Caribe Colombiana en la
búsqueda de principios activos
potencialmente útiles como
antitumorales***

Daneiva del Carmen Caro Fuentes
Candidato

Luis Alberto Franco Ospina Ph.D.
Director

Nirádiz Reyes Ramos Ph.D.
Josefina Zakzuk Sierra Ph.D.
Comité Tutorial

Universidad de Cartagena
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Grupo Evaluación Biológica de Sustancias
Promisorias
Cartagena de Indias, 2021

Tesis doctoral presentada como requisito para optar
por el título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Nota de aceptación

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Cartagena de Indias, Noviembre 29 de 2021

Dedicatoria y agradecimientos

Este trabajo está dedicado a todos los que me apoyaron incondicionalmente para lograr este gran objetivo de vida, a mi compañero y confidente Rubén, a mis padres y hermanos, a mi mejor amiga y co-tutora Yane, a mi tutor Luis Franco y a todos mis compañeros del grupo Evaluación Biológica de Sustancias Promisorias: Davi, Lau, Cathe, Jenny, Indi, Jennifer, Jota y Carlos que muchas veces estuvieron acompañándome y levantándome para seguir adelante. Al Dr. José Luis Espartero por su apoyo incondicional, a mis amigos María, Naza y Jaime quienes siempre me dieron aliento y secaron mis lágrimas cuando estuve lejos de mi familia.

Mis más sinceros agradecimientos al Instituto de Investigaciones Inmunológicas, a la Universidad de Sevilla, a la Universidad Pablo Olavide (Ana, Isa y Juan C.), a la Universidad del Atlántico y especialmente a la Universidad de Cartagena y a Colciencias hoy MinCiencias por el apoyo brindado, especialmente por la financiación de mis estudios doctorales (Convocatoria 647 de 2014) y de los proyectos de investigación que permitieron la consecución de todos los resultados que hoy se muestran en esta tesis doctoral (Contrato 474 de 2012, Contrato 591 de 2013 y Contrato 878 de 2015). También agradezco a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por la financiación de mis estancias doctorales internacionales.

CONTENIDO

ABREVIACIONES	5
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL	12
1. Pertinencia y relevancia de la investigación	13
2. Hipótesis y Objetivos de la tesis	15
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	16
1. Cáncer: definición y epidemiología.....	16
2. Cáncer, una enfermedad de los genes.....	16
3. Tratamiento actual contra el cáncer.....	19
4. Terapia del cáncer basada en el uso plantas medicinales como fuente de moléculas bioactivas.....	21
CAPÍTULO 2. PLANTAS MEDICINALES COLOMBIANAS COMO FUENTE DE METABOLITOS BIOACTIVOS PARA TRATAR EL CÁNCER.....	22
1. Identification of Colombian Caribbean species with potential antiproliferative activity against several types of cancer cell lines - Identificación de especies vegetales de la Costa Caribe Colombiana con potencial actividad anti-proliferativa sobre diversos tipos celulares de cáncer .	24
2. Colombian Caribbean extracts with anti-proliferative activity against lung cancer cell lines - Extractos del Caribe Colombiano con actividad anti-proliferativa frente a líneas celulares de cáncer de pulmón	35
CAPITULO 3. <i>Physalis angulata</i> , ALTERNATIVA NOVEDOSA POTENCIALMENTE ÚTIL PARA TRATAR EL CÁNCER COLORRECTAL.....	44
1. Active fraction of ground cherry (<i>Physalis angulata</i> L.) calyces attenuates azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced colon carcinogenesis in mice - Fracción activa de los cálices del tomatillo (<i>Physalis angulata</i> L.) disminuye la carcinogénesis de colon inducida por azoxymetano (AOM)/dextran sulfato de sodio (DSS) en ratones	46
CAPITULO 4. QUINONAS: COMPUESTOS DE RECONOCIDA UTILIDAD PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	60
1. Transcriptome Changes in Colorectal Cancer Cells upon Treatment with Avicequinone B. Cambios trascripómicos en células de cáncer colorrectal después del tratamiento con Avicequinone B.	62
2. A promising naphthoquinone [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] exerts anti-colorectal cancer activity through ferroptosis and inhibition of MAPK signaling pathway based on RNA sequencing. Una naftoquinona prometedor [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] ejerce actividad frente al cáncer colorrectal a través de ferroptosis e inhibición de la vía de señalización de las MAPK basándonos en resultados del RNA sequencing.	76
DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIÓN	91

PERSPECTIVAS FUTURAS	94
PRODUCCION GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
LISTADO DE ANEXOS	115
Material suplementario (Supporting information) del artículo: Active fraction of ground cherry (<i>Physalis angulata</i> L.) calyces attenuates azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced colon carcinogenesis in mice - Fracción activa de los cálices del tomatillo (<i>Physalis angulata</i> L.) disminuye la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano (AOM)/dextran sulfato de sodio (DSS) en ratones	115
Material suplementario (Supplementary Materials) del artículo: Transcriptome Changes in Colorectal Cancer Cells upon Treatment with Avicequinone B. Cambios transcriptómicos en células de cáncer colorrectal después del tratamiento con Avicequinone B.....	115
Material suplementario (Supplementary information) del artículo: A promising naphthoquinone [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] exerts anti-colorectal cancer activity through ferroptosis and inhibition of MAPK signaling pathway based on RNA sequencing. Una naftoquinona prometedor [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] ejerce actividad frente al cáncer colorrectal a través de ferroptosis e inhibición de la vía de señalización de las MAPK basándonos en resultados del RNA sequencing.	115

ABREVIACIONES

°C: centígrados

$\Delta\Psi_m$: potencial de la membrana mitocondrial

$\mu\text{g/mL}$: microgramos por mililitro

μM : micromolar

AKM53: 8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione

AKT: serine-threonine kinase / serin-treonin quinasa

ANOVA: analysis of variance / análisis de varianza

AOM: azoximetano

APC: gen regulador de la vía de señalización WNT (supresor de tumores)

ATCC: American Type Culture Collection

Avicquinone B: naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione

BRCA1: gen asociado a la reparación del DNA (supresor de tumores)

BRAF: proto-oncogene, serine-threonine kinase / proto-oncogen serin/treonin quinasa

CAC: cáncer asociado a colitis

CCR / CRC: cáncer colorrectal

CI_{50} / IC_{50} : concentración inhibitoria 50 / inhibitory concentration 50

CO_2 : dióxido de carbono

DEGs: differentially expressed genes / genes diferencialmente expresados

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico, material genético

Down-regulated: regulados a la baja

DOXO: doxorubicin / doxorubicina

DSS: dextrán sulfato de sodio

EGFR: epidermal growth factor receptor / receptor del factor de crecimiento epidermal

EMEM: Eagle's Minimal Essential Medium

ERK: extracellular signal-regulated MAP kinase / MAPquinasa regulada por señales extracelulares

EROs: especies reactivas de oxígeno

FA: fatty acids / ácidos grasos de cadena larga

FBS: Fetal Bovine Serum / suero fetal bovino

FPKM: fragmentos por kilobase del transcritpo por millón de fragmentos mapeados

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GEBS: Grupo Evaluación Biológica de Sustancias Promisorias

GO: gene ontology / ontología génica

GSH: glutathione / glutatión

H&E: hematoxilina-eosina / hematoxylin-eosin

HIF: factor de transcripción

HPLC: High Performance Liquid Chromatography / cromatografía líquida de alta resolución

HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 / hipoxantina fosforibosil transferasa 1

i.p.: intraperitoneal

IBD / EII: Inflammatory Bowel Disease / Enfermedad Inflamatoria Intestinal

IC: intervalo de confianza

IFNs: interferons / interferones

IL-1 β : interleukin 1 β / interleuquina 1 β

IL-4: interleukin 4 / interleuquina 4

IL-6: interleukin 6 / interleuquina 6

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

IRGs: interferon regulated genes / genes regulados por interferón

JNK: c-Jun NH2-terminal kinase / quinasa c-Jun NH2 terminal

KRAS: proto-oncogene, GTPase / proto-oncogen GTPasa

LD₅₀: Lethal Doses 50 / dosis letal 50

LPS: Lipopolisacárido

MAPKs: mitogen activated protein-kinase / proteínas-quinasas activadas por mitógenos

MEKi: mitogen-activated protein kinase inhibitors / inhibidores de las proteínas-quinasas activadas mitógenos

miRNAs: microRNAs

MMR: DNA mismatch repair

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide / bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MYC: proto-oncogene, bHLH transcription factor / proto-oncogen factor de transcripción bHLH

NCDs: Noncommunicable diseases / Enfermedades crónicas no transmisibles

NCI: National Cancer Institute / Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos

NF- κ B: factor de transcripción nuclear κ B

NO: Óxido nítrico

NPNDP: Program for Natural Products Discovery / Programa para el descubrimiento de productos naturales

NQs: naphthoquinones / naftoquinonas

OD_{550nm}: densidad óptica o absorbancia a 550 nm

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development / Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

ONC: Observatorio Nacional de Cáncer (Colombia)

p38: mitogen-activated protein kinase p38 / proteína quinasa p38 activada por mitógenos

PADF / F0-2: *Physalis angulata* dichloromethane fraction / fracción en diclorometano obtenida del extracto de los cálices de *P. angulata*

PCNA: proliferating cell nuclear antigen / antígeno nuclear de células en proliferación

PGE 2: prostaglandina E 2

PI: propidium iodide / yoduro de propidio

PI3K: phosphatidylinositol-3'-kinase / fosfatidilinositol 3 quinasa

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PTEN: phosphatase and tensin homolog

RNA: ribonucleic acid / ácido ribonucleico

RNA-seq: RNA-sequencing / secuenciación de ARN

RT-qPCR: quantitative real-time PCR / PCR cuantitativa en tiempo real

SEM o EEM: standard error of mean / error estándar de la media

SI / IS: selective index / índice de selectividad

TAMs: macrófagos asociados a tumores

TPA: 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TP53: tumor protein p53

Up-regulated: regulados al alta

WHO / OMS: Whorld Health Organization / Organización Mundial de la Salud

W/L ratio: relación peso/longitud del colon

RESUMEN

En la búsqueda de metabolitos bioactivos para tratar enfermedades crónicas no transmisibles, se han identificado diferentes fuentes naturales que, a lo largo de la historia, han sido proveedoras de fármacos que hacen parte de la terapia actual. Esta práctica se mantiene vigente y más aún, cuando se trata de desarrollar alternativas farmacológicas novedosas contra enfermedades como el cáncer que, si bien cuenta con una variedad de tratamientos, ninguno es curativo y su uso tiene serias consecuencias fisiológicas y psicológicas en el paciente que las utiliza. En esta tesis doctoral, abordamos las diferentes etapas de la obtención de sustancias con potencial terapéutico contra el cáncer, a través de la evaluación de extractos vegetales, fracciones enriquecidas en metabolitos secundarios y compuestos de síntesis orgánica, cuya fuente de obtención principal son las plantas medicinales de la Costa del Caribe Colombiano. En la primera etapa se evaluó la actividad citotóxica y anti-proliferativa de 31 extractos etanólicos totales obtenidos a partir de especies vegetales de la región, frente a las líneas de cáncer HT-29 (colorrectal), A549 y H292 (pulmonar), PC-3 (prostático), MDA-MB-231 (de mama), HeLa (cervical), utilizando el ensayo de reducción metabólica del MTT, obteniéndose para cada extracto activo, los valores de CI_{50} . De los extractos evaluados, once (11) mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de al menos una línea celular de origen neoplásico, resaltándose dentro de este grupo, el extracto de *B. simaruba*, puesto que inhibió el crecimiento de todas las líneas neoplásicas a concentraciones bajas y, además mostró ser selectivo inhibiendo en menor proporción el crecimiento de líneas celulares normales (fibroblastos humanos fetales MRC-5 y fibroblastos murinos embrionales 3T3-L1). En la segunda etapa, evaluamos el potencial terapéutico de la fracción en diclorometano obtenida del extracto total de los cálices de *P. angulata* (PADF) utilizando modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados muestran que esta fracción enriquecida en ésteres de sacarosa, no solo posee actividad anti-inflamatoria como se reportó en estudios previos, sino que además posee actividad citotóxica y anti-proliferativa sobre células de cáncer colorrectal HT-29 mediante inducción de arresto celular en fase G2/M y apoptosis, inhibición de la migración celular, fragmentación del DNA, que producen daños irreversibles en la línea celular. Sumado a lo anterior, en el modelo *in vivo* de cáncer asociado a colitis (CAC, AOM/DSS), PADF redujo la carga tumoral, la severidad de la enfermedad y promovió la recuperación del tejido colónico, efectos asociados a la disminución de citoquinas pro-inflamatorias, proteína PCNA la cual está incrementada en procesos de inflamación y cáncer, aumento de la expresión de p38 (inductora de apoptosis) y MAPKs. La tercera etapa de la tesis estuvo enfocada a profundizar en el estudio de los mecanismos de acción asociados al efecto anti-proliferativo y citotóxico de dos (2) derivados quinoidales de origen natural obtenidos por síntesis orgánica, nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (avicequinone B) y [8-hydroxi-2-(2-tienilcarbonil) nafto[2,3-b]tiofen-4,9-diona] (AKM53); los cuales, en estudios previos, inhibieron el crecimiento de la línea celular HT-29, afectando en menor proporción el crecimiento de fibroblastos humanos normales dérmicos PCS-201-012. Los resultados obtenidos revelan que ambos compuestos disminuyen la capacidad de formación de colonias de células HT-29, inducen arresto en fase G2/M y necrosis. Además, el análisis de RNA sequencing (RNA-seq) mostró que la actividad biológica observada se encuentra relacionada con la reducción en la expresión de genes que actúan en vías de señalización de proliferación celular (JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT), así como inducción de ferroptosis

como forma de muerte celular, expresión de miR-21 y estrés oxidativo en células de cáncer colorrectal HT-29.

Todos estos aportes científicos enriquecen el conocimiento disponible respecto a fuentes de metabolitos secundarios potencialmente útiles para tratar el cáncer, además, proporcionan un soporte científico al uso empírico y etnofarmacológico dado a estas especies vegetales. La fracción enriquecida (PADF) y los compuestos estudiados (avicequinone B y AKM53), podrían convertirse en un futuro no muy lejano, en coadyuvantes de utilidad en la terapia contra el cáncer, especialmente del cáncer colorrectal, contando con importantes avances en la elucidación de los mecanismos moleculares, pero aún se requieren estudios adicionales *in vivo* sobre su farmacocinética, farmacodinamia así como de diseño de formulación para poder acercarnos aún más a nuestro objetivo principal: la creación de un producto farmacéutico que pueda ser incluido en la terapia disponible contra el cáncer.

ABSTRACT

In the searching for bioactive metabolites to treat chronic non-communicable diseases, different natural sources have been identified that have been drug providers throughout history. This practice is valid when it wants to find new pharmacological alternatives to treat cancer, a disease with a defined therapy but associated with severe secondary effects that disturb the patient physiologically and psychologically. This doctoral thesis was conducted to approach the phases of cancer drug discovery by evaluating extracts, enriched fractions, and compounds whose primary source of obtaining are medicinal plants belonging to Colombian Caribbean flora. In the first stage, the cytotoxic and anti-proliferative activity of 31 total extracts were evaluated against a cancer cell line panel (HT-29, A549, H292, PC-3, MDA-MB-231, HeLa), using the MTT method. The results showed that 11 extracts affected the growth of at least one cancer cell line, being *B. simaruba* extract was the most active and selective extract. The second stage evaluated the anti-cancer potential of dichloromethane fraction obtained of *P. angulata* total ethanolic extract (PADF) using *in vitro* and *in vivo* experimental models. The results showed that this fraction enriched in sucrose esters has cytotoxic and anti-proliferative activity against HT-29 cell line, inducing G2/M arrest, apoptosis, inhibition of cell migration, and DNA fragmentation that leads to irreversible damage compromises the cancer cell life. In the *in vivo* CAC model, PADF reduced the tumoral load, the severity of disease and promoted the regeneration of the colonic tissue. These effects were associated with reducing pro-inflammatory cytokines and PCNA protein, which is increased in inflammatory and cancer processes, and promoting the expression of p-38 proapoptotic protein and MAPKs. The third and final stage delves into the study of cytotoxic and anti-proliferative mechanisms of two synthetic compounds: Avicequinone B and AKM53, which in previous works showed a selective potent growth inhibitory activity against HT-29 colorectal cancer cell line. The results showed that both compounds diminished the capability of HT-29 colony formation, inducing G2/M arrest and necrosis. RNA-seq analysis showed that the compounds biological activity is linked with the reduction of expression of cell proliferation genes (JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT), ferroptosis induction, and oxidative stress and expression of miR-21. These scientific contributions improved the knowledge concerning sources of secondary metabolites potentially useful to treat cancer, providing scientific support to empirical and ethnopharmacological use of the studied species. In the near future, PADF enriched fraction and studied compounds (avicequinone B and AKM53) could be coadjuvants in cancer therapy, especially in colorectal cancer, these compounds have molecular action mechanisms supported but require additional studies about the pharmacokinetic and pharmacodynamic effects as well as formulation design to get closer to the main objective: the generation of a pharmaceutical product that can be included in the available cancer therapy.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL

El cáncer se ha convertido en una de las primeras causas de mortalidad en la gran mayoría de países del mundo. Aunque existe una terapia definida que alivia signos y síntomas de la enfermedad, sigue siendo incierta la reacción que pueda tener cada paciente hacia su implementación ya que, en algunos casos, no funciona o hay recidivas que afectan negativamente la calidad de vida del paciente. Adicionalmente, los fármacos que se utilizan no son selectivos y afectan tanto a células cancerosas como a células normales. Todos estos factores han conducido a que la población afectada por la enfermedad acuda al empleo de alternativas terapéuticas que provengan de la naturaleza, basándose en el conocimiento ancestral de las especies de una región, práctica que a lo largo de los años ha sido de gran provecho ya que, un gran porcentaje de los fármacos que se utilizan en la terapia actual son metabolitos secundarios extraídos de fuentes naturales y, a través de procesos de síntesis o semi-síntesis se han podido obtener en grandes cantidades a fin producirlos a escala industrial y suplir las necesidades mundiales pero además mediante estos procesos es posible mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Colombia es uno de los pocos países megadiversos del mundo, contando con una enorme riqueza de especies vegetales con potencial para proveer metabolitos útiles para el tratamiento del cáncer. En este primer capítulo, el lector encontrará una breve descripción de la problemática actual relacionada con el cáncer, así como la justificación de la creciente necesidad de buscar alternativas terapéuticas o coadyuvantes basándonos en la exploración de nuestra flora. Adicionalmente, se muestran los objetivos y la hipótesis planteada que sustentan el desarrollo de esta tesis doctoral.

En el capítulo 1. “Introducción general” se presenta un resumen de los puntos más importantes sobre el cáncer, enfermedad abordada durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, en donde se describe el inicio y desarrollo de la patología en humanos, se presentan datos epidemiológicos, de diagnóstico y tratamientos disponibles actualmente para combatir el impacto en la población, además, se describen los problemas asociados al uso de la terapia, lo que fundamenta el presente estudio.

En los capítulos 2. “Plantas medicinales colombianas como fuente de metabolitos bioactivos para tratar el cáncer” y 3. “*Physalis angulata*, alternativa novedosa potencialmente útil para tratar el cáncer colorrectal” agrupamos los resultados obtenidos en la ejecución de diversos ensayos biológicos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, encaminados a identificar especies vegetales promisorias a partir de extractos obtenidos de plantas medicinales de la Costa Caribe Colombiana, con especial énfasis en la especie vegetal *Physalis angulata* L., profundizándose en el estudio fitoquímico, toxicológico y algunos mecanismos moleculares asociados a su actividad biológica.

En el capítulo 4. “Quinonas: Compuestos de reconocida utilidad para el tratamiento del cáncer”, se muestran resultados relacionados con la elucidación de los mecanismos asociados a la actividad biológica frente al cáncer colorrectal de dos (2) compuestos altamente activos

frente a varios tipos celulares de cáncer, los cuales fueron sintetizados y suministrados por el Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena y por el Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry de la University of Münster, Alemania, en el marco de la ejecución de proyectos de investigación conjuntos, en donde previamente se evaluaron 36 derivados con núcleo quinoidal base (nafto[2,3-b]furan-4,9-diona) [1]. Estos compuestos, denominados naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (Avicequinone b) y 8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (AKM53), se seleccionaron en función de su capacidad inhibitoria de la proliferación celular frente a varios tipos celulares de cáncer humano, además de tratarse de compuestos de tipo quinoidal, considerados como uno de los grupos de agentes antitumorales más importantes en el que se incluyen reconocidos fármacos como la Doxorubicina, Daunorrubicina, o Mitomicina C, actualmente utilizados en clínica para combatir el cáncer. Adicionalmente, la Avicequinone B fue inicialmente aislada de la corteza del tallo del manglar *Avicennia alba* en el año 2000 por Ito *et al* [2] y con el paso de los años se han diseñado varias rutas para su obtención dado su potencial farmacológico. Por su parte, AKM53, que corresponde al segundo compuesto estudiado, fue inicialmente obtenido mediante modificaciones estructurales del Lapachol, compuesto de reconocida actividad citotóxica, extraído de los tallos de *Tabebuia spp.*

Por último, se muestran los apartes titulados “*Discusión final y conclusión*”, “*Perspectivas futuras*” y “*Producción generada durante el desarrollo de la tesis doctoral*”, en donde se sintetizan claramente todas las contribuciones y aportes generados al ejecutar esta tesis. A parte de mi formación doctoral se generaron varios productos de apropiación social del conocimiento, (publicaciones en revistas científicas y presentaciones en eventos científicos nacionales e internacionales); cuyo contenido completo se encuentra disponible en las diferentes bases de datos. Adicionalmente, se mencionan las actividades que se continuarán desarrollando con el fin de generar conocimiento que nos permita acercarnos un poco más a la meta final de incluir nuevas alternativas terapéuticas en el tratamiento actual contra el cáncer, ya sea como un tratamiento propiamente dicho o como coadyuvantes a la misma, todo ello encaminado a mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta patología.

1. Pertinencia y relevancia de la investigación

El cáncer consiste en el crecimiento desequilibrado de células con una inestabilidad genómica que genera aumento de su proliferación y resistencia a la apoptosis [3]. Esta enfermedad afecta los genes de las células y, cuando estas células con mutaciones sobrepasan en número a las células normales, el tejido pierde la capacidad de funcionar de manera regulada rompiéndose la homeostasis [4]. Este fenómeno puede suceder en cualquier parte del cuerpo y, propagarse a órganos y tejidos circundantes o distantes al sitio de iniciación [3]. En los últimos años, se ha convertido en un grave problema de salud pública que va en alarmante aumento y, en muchos países, se ha posicionado como la principal causa de muerte por enfermedades crónicas no transmisibles [5].

Este incremento de la mortalidad por causa del cáncer, ha convertido a esta patología en un blanco de estudio científico, enfocando los esfuerzos hacia el conocimiento de su etiología,

diagnóstico y tratamiento, siendo este último punto, uno de los más trascendentales, debido a que a pesar de que existen alternativas eficaces como la resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia, el entendimiento de la respuesta individualizada de los pacientes hacia ellas sigue siendo desconocida y poco predecible, ya que en algunos casos, luego de recibir las, la persona puede recuperarse, en otros se mejoran y luego recaen y, en el peor de los casos, la condición se agrava, debido a que la quimioterapia no solo afecta el crecimiento y propagación de células cancerosas sino también el de células normales, lo que origina un deterioro en la calidad de vida del paciente al provocar efectos secundarios no deseados que lo deterioran física y psicológicamente, tanto que pueden trascender al campo familiar, social y económico, comprometiendo de esta manera, la adherencia a la terapia [6,7]. Otro agravante que compromete la eficacia de la terapia es la resistencia que han desarrollado las células madres cancerígenas, a pesar de que éstas, constituyen sólo un pequeño porcentaje de la masa tumoral total [8,9]. El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (National Cancer Institute, NCI por sus siglas en inglés), es uno de los líderes mundiales en investigación del cáncer y, a través de esta organización, se han creado programas que involucran el descubrimiento, la creación y formulación de tratamientos con mayor eficacia y menos toxicidad, dentro de las cuales se incluyen las terapias dirigidas, las inmunoterapias, vacunas y, en este último año, lanzó el “Program for Natural Products Discovery (NPNPD)” que consiste en obtener muestras pre-fraccionadas a través de métodos analíticos para el rápido aislamiento e identificación de productos naturales biológicamente activos contra el cáncer [10]. Sin embargo, aún es necesario continuar profundizando en el estudio de esta patología, con especial énfasis en la investigación y desarrollo de nuevas opciones o alternativas de origen natural o productos obtenidos de síntesis basados en estructuras químicas previamente descubiertas en fuentes naturales, que permitan brindar al paciente una mejor terapia.

En ese sentido, nuestro grupo de investigación, Evaluación Biológica de Sustancias Promisorias (GEBSP), en cooperación con otros grupos nacionales e internacionales (Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena, Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena-LIFFUC, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry of University of Münster, entre otros colaboradores) hemos desarrollado diferentes proyectos orientados a la exploración etnofarmacológica de nuestra flora y la evaluación de compuestos obtenidos por procesos de semi-síntesis orgánica, con resultados alentadores que nos acercan a la obtención de fracciones enriquecidas y compuestos potencialmente útiles como alternativas terapéuticas o coadyuvantes para el tratamiento de esta patología de alto impacto en la salud pública. Acorde con este planteamiento y teniendo en cuenta que Colombia es un país que cuenta con un elevado porcentaje de especies vegetales que no han sido estudiadas, en esta tesis doctoral se planteó como propósito general contribuir a la búsqueda de coadyuvantes de tratamiento o alternativas terapéuticas novedosas potencialmente útiles como terapia contra el cáncer, a través de la evaluación de la actividad biológica de extractos, fracciones y compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales o procesos semi-sintéticos.

2. Hipótesis y Objetivos de la tesis

Aunque existen tratamientos científicamente reconocidos y eficaces contra el cáncer, también existen muchos efectos secundarios asociados a su uso que, sumado a los altos costos del tratamiento, afectan de manera directa la calidad de vida del paciente, sin asegurar la cura definitiva de la enfermedad; razones que mantienen permanente la necesidad de obtener nuevas terapias y, en este sentido, la principal tendencia es la búsqueda de moléculas bioactivas a partir de los productos naturales y la creación de rutas sintéticas o de semi-síntesis para su obtención o para realizar modificaciones estructurales que permitan mejorar sus propiedades farmacológicas. Con el fin de ayudar a mitigar esta problemática actual, y proporcionar bases para el desarrollo de nuevas terapias o coadyuvantes que ayuden a mejorar el tratamiento terapéutico integral de los pacientes con cáncer, nos planteamos la siguiente hipótesis:

¿Es posible identificar extractos, fracciones o compuestos con promisorio actividad anti-proliferativa frente a células de varios tipos de cáncer que puedan ser utilizadas como adyuvantes de tratamiento o alternativas terapéuticas novedosas para tratar esta patología?

Para dar respuesta a esta pregunta problema, se plantearon los siguientes *objetivos*:

- Evaluar la actividad anti-proliferativa *in vitro* de extractos totales obtenidos de plantas medicinales de la flora del Caribe Colombiano frente a líneas celulares de cáncer humano y líneas celulares normales y establecer índices de selectividad (SI / IS) para aquellos que muestren actividad.
- Realizar el fraccionamiento biodirigido a través de la evaluación de la actividad anti-proliferativa *in vitro* de los extractos o fracciones enriquecidas que muestren mayor actividad frente a las líneas de cáncer de relevancia para el grupo de investigación.
- Determinar la toxicidad *in vivo* del extracto o la fracción enriquecida con mayor potencial anti-cáncer de acuerdo a los protocolos establecidos por la OECD.
- Evaluar el efecto frente al cáncer asociado a colitis (CAC) del extracto o la fracción enriquecida de mayor actividad en el modelo *in vivo* de cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS, identificando posibles mecanismos de acción relacionados.
- Evaluar el efecto anti-proliferativo frente a la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 de una serie de derivados quinoidales obtenidos a partir del núcleo base (nafto[2,3-b]furan-4,9-diona), y profundizar en los mecanismos de acción a través de la identificación de las posibles dianas moleculares implicadas en el efecto citotóxico de los compuestos que muestren mayor actividad biológica.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. *Cáncer: definición y epidemiología*

El término “cáncer” se utiliza para describir a un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento y propagación de células con inestabilidad genómica que conlleva al aumento desequilibrado de su proliferación y resistencia a la apoptosis [3]. Este evento puede suceder en cualquier tejido de un organismo y se puede propagar a órganos y a otros sistemas circundantes o distantes al sitio de iniciación, suceso conocido como metástasis, la cual ocurre en los estadios finales de la enfermedad y con frecuencia causa la muerte de la persona que padece la enfermedad [3]. El cáncer hace parte del grupo conocido como enfermedades crónicas no transmisibles (NCDs por sus siglas en inglés), las cuales se caracterizan por ser de larga duración, producir un deterioro prolongado de la calidad de vida del paciente y, regularmente, son el resultado de la asociación de varios factores, tales como la genética, la fisiología, el ambiente y los hábitos de vida [4]. Según las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer ocupó el primer y segundo lugar como causa de muerte principal en 112 países posicionándolo como un grave problema de salud pública que en el año 2020 llegó a cobrar la vida de 9'958.133 de personas en el mundo, siendo el pulmonar el tipo de cáncer que ocasionó más muertes (1'796.144 – equivalente al 18% del total de muertes por la patología), seguido del colorrectal (915.880 – 9.2%), hepático (830.180 – 8.3%), estomacal (768.793 – 7.7%) y el de mama (684.996 – 6.9%) [5]. Colombia, no se aparta de esta realidad mundial, en el año 2020 esta enfermedad cobró la vida de 54.987 personas y el comportamiento epidemiológico por tipo de cáncer cambia ligeramente, siendo el cáncer de estómago el que cobra más vidas (11.7% muertes por cáncer), seguido por el pulmonar (11.1%), el de mama (8%), el colorrectal (7.4%) y el de próstata (7%) [11].

2. *Cáncer, una enfermedad de los genes*

La capacidad regenerativa y de reparación que poseen todas las células que hacen parte de los tejidos de nuestro organismo se encuentra bajo un control biológico que regula de manera precisa la expresión de genes que participan en la síntesis de proteínas que se requieren para el desarrollo, diferenciación y homeostasis. Sin embargo, una célula puede sufrir lesiones o daños en su material genético o DNA (mutaciones) que no se reparan de manera apropiada, originándose genes mutados o células con genoma aberrante que, luego de sucesivas reproducciones a mayor escala, pueden afectar el control del ciclo celular y la expresión de proteínas implicadas en el crecimiento, proliferación y división y, en última instancia, podrían resultar en cáncer [4,12,13].

En el ser humano coexisten cientos de diferentes tipos celulares especializados, cuyas funciones dependen de los genes que se encuentren activos para el correcto desarrollo de sus funciones [4] y, en cualquiera de estas células puede ocurrir una mutación, generarse un tumor y, posteriormente, un cáncer. Esta es una patología genética, pero en la mayoría de los casos no es hereditaria, es decir, que a pesar de que se afectan los genes, normalmente son

las células somáticas las que sufren alteraciones en su expresión génica, sin embargo, también se han detectado mutaciones en células de la línea germinal lo que predispone al individuo que las padece a ser susceptible a desarrollar cáncer [4,13]. Las mutaciones pueden ser causadas por factores externos, como organismos infecciosos, exposición a sustancias ambientales (químicas y radiaciones) y una variedad de hábitos no saludables (tabaquismo, alimentación desbalanceada y sedentarismo) y, factores internos, como errores en la replicación, transcripción o reparación del DNA, cambios hormonales y afecciones del sistema inmunitario. Estas variables pueden intervenir juntas o independientes y ocasionan cambios en la secuencia de genes de células somáticas promoviendo crecimiento rápido y descontrolado, pérdida de la expresión de genes supresores de tumores o de la regulación de oncogenes, generación de nuevas células que expresen las mutaciones, capacidad de competir por los nutrientes con células normales, lo que detiene el crecimiento de estas últimas, favoreciendo la invasión del tejido, incluso la invasión hacia otros órganos y sitios circundantes [7,13] y, en muchos casos pasan más de diez años para que lo detecten y en ocasiones no se logran detectar a tiempo [4,14].

Nuestro organismo a fin de contrarrestar los efectos de las mutaciones del DNA posee un sistema denominado *DNA damage response*, el cual repara las lesiones a las que se encuentra expuesto el material genético celular ocasionadas por factores mencionados anteriormente. Este sistema no solo detecta el daño, sino que también emite señales y media la reparación, proceso crucial para el desarrollo de múltiples funciones biológicas tales como el desarrollo de la respuesta inmune, la recombinación meiótica y prevención de una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer [15]. Defectos hereditarios o adquiridos en el sistema de reparación del DNA son desfavorables para el desarrollo de un organismo, predisponiéndolo al desencadenamiento de múltiples anomalías en la meiosis (esterilidad), deficiencias inmunitarias, neurodegeneración, envejecimiento prematuro y desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Dentro de mecanismos moleculares responsables de la reparación del DNA encontramos al *DNA mismatch repair* (MMR), el cual es altamente conservado tanto en procariotas como en eucariotas y fundamentalmente corrige errores de inserción/delección de bases que se generan en los procesos de replicación y recombinación del DNA, y daños en las proteínas que participan en esta vía predisponen a la aparición de algunos cánceres hereditarios y resistencia a ciertos agentes quimioterápicos. Otras vías moleculares que participan en la corrección de errores causados por el daño al DNA son la unión de extremos no homólogos, recombinación homóloga y la reparación por escisión de nucleótidos, en donde participan una variedad de proteínas como las quinasas ATM y ATR, y las DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase*) claves para detección de daños, los *Chromatin remodelers* que permiten el acceso de la maquinaria de reparación al material genético para su reparación y las proteínas reparadoras RPA, Rad51, p53, la superfamilia de las RAS GTPase [15,16].

Independientemente el agente causante de la mutación, un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células genómicamente inestables (con mutaciones), lo que se denomina formación del tumor o neoplasia, y luego de la acumulación de los cambios en la expresión genética de las células anormales, se da el segundo proceso conocido como metástasis que se refiere a la capacidad invasiva de las

células, permitiéndoles escapar de su sitio de origen, colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos [4]. Dentro de las ventajas selectivas que tienen las células mutantes con respecto a otras células están [4,13]:

-La resistencia a la muerte celular programada (apoptosis): Cuando no es posible reparar el daño en el DNA, dentro de la célula se inicia el proceso de muerte celular, una de las más conocidas es la apoptosis la cual se activa en respuesta a estímulos intrínsecos y extrínsecos, especialmente cuando se detecta una alteración genética. Las células de un cáncer por lo general poseen una protección contra la apoptosis lo que las distingue de las células normales. La vía de supervivencia celular que utilizan comúnmente las células cancerígenas para evadir la apoptosis es la activación de las quinasas PI3K-PKB/AKT [13].

-Activación sostenida de vías de proliferación celular (en ausencia de señales extracelulares) y evasión o neutralización de señales supresoras del crecimiento celular: El desarrollo de estas capacidades está respaldado por la alteración de dos categorías de genes implicados en la transformación y proliferación de las células cancerígenas. Los genes supresores de tumores dan origen a la expresión de proteínas que restringe el crecimiento celular y, su importancia fue evidente ya que una característica común que presentan células de distintos tipos de cáncer es que las regiones específicas de cromosomas en donde se encuentran normalmente estos genes no existían, lo que ayudo a la correlación de que los genes interfieren y evitan el desarrollo de un tumor; dentro de los más importantes se encuentran el TP53, APC, BRCA1, PTEN, entre otros. La otra categoría, conocida como oncogenes, son aquellos que codifican para proteínas que originan una pérdida de mecanismos que controlan el crecimiento celular y la conversión de una célula a un estado maligno, dentro de este grupo se destacan los oncogenes MYC, EGFR, KRAS, BRAF, PI3K/AKT, etc.[4,13,15].

-Metástasis: las células de cáncer cuando se han reproducido múltiples veces y han acumulado tantas mutaciones, con el paso del tiempo puede adquirir la capacidad de diseminarse desde el tumor primario e invadir sitios distantes en donde pueden originar tumores secundarios. Uno de los genes involucrados en este proceso es el gen protector del genoma TP53 [13].

3. Tratamiento actual contra el cáncer

Dentro de los tratamientos disponibles para contrarrestar el cáncer existen alternativas como la resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia, las cuales actúan de manera local (remoción parcial o total de la lesión o área afectada y uso de rayos de alta energía) y pueden usarse solas o combinadas con las que actúan de manera sistémica (medicamentos, células, etc. administrados directamente en el torrente sanguíneo – **Tabla 1.**). El uso, aplicación y eficacia de estas terapias dependen de varios factores, dentro de los más importantes están el tipo y estadio del cáncer, el diagnóstico temprano basado en la detección de marcadores genéticos y epigenéticos y la historia clínica y familiar del paciente [6,7,17,18].

Tabla 1. Tratamientos sistémicos utilizados para el cáncer disponibles en Colombia [18,19]

Grupo Farmacológico – Mecanismo de acción	Fármacos
Agentes alquilantes (unión covalente con el DNA)	Ciclofosfamida, Ifosfamida, Clorambucilo, Busulfán, Melfalán, Carmustina, Dacarbazina, Temozolamida, Trabectedina, Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatinato,
Antibióticos antitumorales (inhibidores de la topoisomerasas)	Bleomicina, Antraciclinas (Doxorrubicina, Daunorrubicina, Epirubicina, Idarrubicina), Dactinomicina, Mitomicina, Etopósido, Irinotecán, Topotecán
Antimetabolitos (Interactúan indirectamente con el DNA)	Azacitidina, Citarabina, Cladribina, Decitabidina, Fludarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Capecitabina, Pemetrexed, Hidroxiúrea, Metotrexato,
Inhibidores del huso mitótico	Cabazitaxel, Docetaxel, Paclitaxel, Ixabepilona, Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina,
Agentes hormonales y diferenciadores	Tamoxifeno, Letrozol, Anastrozol, Exemestano, Fulvestrant, Abiraterona
Inhibidores de las tirosinaquinasas	Axitinib, Dasatinib, Erlotinib, Genfitinib, Imatinib, Lapatinib, Nilotinib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib, Everolimus, Temsirolimus, Ruxolitinib, Vemurafenib
Modificadores de la respuesta inmunológica	Interferón- α , Interlequina-2, Anticuerpos monoclonales (Alemtuzumab, Bevacizumab, Pertuzumab, Trastuzumab, Cetuzimab, Rituximab, Ibritumumab, Ipilimumab, Panitumumab)
Inhibidores del proteosoma	Bortezomib
Inhibidores de la vía Hedgehog	Vismodegib

Estos tratamientos si bien disminuyen los signos y síntomas de la enfermedad, la reacción de los pacientes hacia ellas sigue siendo desconocida y poco predecible, ya que, en muchos casos, el paciente luego de recibirlas algunos recuperan su estado de salud, mientras que otros no y unos recaen, por tanto, el entendimiento de la respuesta individualizada sigue siendo un misterio. El tratamiento del cáncer es considerado un tema crítico y vital, por lo que normalmente el paciente se somete a una combinación de varias alternativas de tratamiento, como la resección tumoral completa seguida de sesiones de quimioterapia o radioterapia a fin de obtenerse los mejores resultados [6,7,17,18]. Los regímenes más comunes se agrupan en la **Tabla 2.**

Adicional a la respuesta individualizada, el tratamiento para el cáncer genera una serie de reacciones en el organismo que compromete la adherencia del paciente al tratamiento, tales como, inhibición del crecimiento y propagación no solo de células cancerosas sino también el de células normales, lo que origina un deterioro en la calidad de vida del paciente al provocar efectos secundarios no deseados, desarrollo de mecanismos moleculares en las células tumorales que le permiten resistir al tratamiento. Por tanto, es importante seguir

investigado en este campo a fin de encontrar opciones con mayor eficacia y menor toxicidad que enriquezcan a la terapia disponible y de esta manera evitar recidivas, reacciones adversas y mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer [17,20].

Tabla 2. Régimen terapéutico contra varios tipos de cáncer utilizados en Colombia [19]

Medicamentos	Indicación	Efectos tóxicos asociados a la terapia
FAC: 5-fluoruracilo, Doxorubicina, Ciclofosfamida	Carcinoma de mama	Alopecia, náuseas, mielosupresión, mucositis, cardiotoxicidad, neoplasias secundarias
AC: Doxorubicina, Ciclofosfamida		
CMF: Ciclofosfamida, Metotrexato, 5-fluoruracilo		
Mayo: 5-fluoruracilo, Folinato (leucovorina)	Carcinoma de colon y recto	Mucositis, diarrea, mielosupresión
CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona	Linfoma no Hodgkin	Alopecia, náuseas, mielosupresión, mucositis, neuropatía periférica, cardiotoxicidad, neoplasias secundarias
ABVD: Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina	Linfoma Hodgkin	Alopecia, náuseas, mielosupresión, mucositis, fiebre, mialgias, neuropatía periférica, cardiotoxicidad
EP: Etopósido, Cisplatino	Carcinoma testicular y de pulmón	Nauseas, nefrotoxicidad, ototoxicidad, hipopotasemia, hipomagnesemia, mielosupresión
Carboplatino, Paclitaxel	Carcinoma de ovario y de pulmón	Nauseas, alopecia, mialgias, artralgias, neuropatía periférica, mielosupresión
Cisplatino, Gemcitabina	Carcinoma de pulmón y vejiga	Nauseas, nefrotoxicidad, ototoxicidad, hipopotasemia, hipomagnesemia, fatiga, mielosupresión
Cisplatino, Docetaxel	Carcinoma de pulmón	Nauseas, alopecia, mielosupresión, nefrotoxicidad, ototoxicidad, hipopotasemia, hipomagnesemia, neuropatía periférica, edema
Cisplatino, 5-fluoruracilo	Carcinomas aerodigestivos	Nauseas, mucositis, diarrea, nefrotoxicidad, ototoxicidad, hipopotasemia, hipomagnesemia, mielosupresión
Cisplatino con radioterapia	Carcinoma cervicouterino	Nauseas, nefrotoxicidad, ototoxicidad, hipopotasemia, hipomagnesemia, mielosupresión
Folfox-4 o 6: Oxaliplatino, 5-fluoruracilo, Folinato (leucovorina)	Carcinoma de colon y recto	Mucositis, diarrea, mielosupresión, neuropatía periférica, dolor en brazo
IFL: Irinotecán, 5-fluoruracilo, Folinato (leucovorina)	Carcinoma de colon y recto	Diarrea, mucositis, mielosupresión

4. *Terapia del cáncer basada en el uso plantas medicinales como fuente de moléculas bioactivas*

Desde tiempos milenarios, las plantas proporcionan al hombre no solo alimento, sino que también representan una fuente de sustancias que mitigan y curan los diferentes signos y síntomas que se presentan cuando se tiene una enfermedad. Su modo de empleo va desde el uso de preparaciones obtenidas de sus diferentes órganos hasta el consumo de compuestos y principios activos aislados a través de diferentes procesos. El potencial terapéutico de las plantas se empieza a explorar normalmente en zonas rurales en donde la asequibilidad al medicamento es limitada, hecho que contrasta con la abundancia de especies vegetales que crecen en esas áreas. De hecho, en Colombia existe un conglomerado de especies vegetales, cuyo uso popular ha sido reconocido por el INVIMA a través de la resolución 2834 de 2008, por la cual se adopta el Vademécum de Plantas Medicinales Colombiano y se establecen los lineamientos para su actualización, además, se reconoce como referencia obligatoria para expedir el registro sanitario de los productos fitoterapéuticos tradicionales en el país [21,22]. Esta práctica común mundialmente reconocida, es útil para tratar todo tipo de enfermedades, incluyendo el cáncer. De hecho, casi el 70% de los fármacos que se utilizan hoy en día para tratar el cáncer, tiene un origen basado en algún producto natural (planta o animal), ya sea por aislamiento directo del metabolito activo o por modificaciones estructurales de alguno de sus compuestos usando la síntesis orgánica. Como evidencia de ello, podemos mencionar algunos ejemplos como los alcaloides vinblastina y vincristina que se aislaron de vinca (*Catharanthus roseus* G. Don.) que se usan en combinación con otros quimioterápicos, al igual que el paclitaxel, aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt [20,23–26]. Como se indicó anteriormente, hay fármacos que se han obtenido como producto de modificaciones en la estructura química de metabolitos aislados de plantas, tal es el caso del etopósido y tenipósido, dos derivados semi-sintéticos de la epipodophylotoxina obtenida de la planta *Podophyllum peltatum* L., el irinotecán, derivado semi-sintético de la camptotecina que es un compuesto aislado de la planta *Camptotheca acuminata* Decne y fue utilizado como agente anticancerígeno hasta que se descubrió su elevada toxicidad a nivel vesical [20,23–27].

Esta evidencia sustenta el éxito de utilización de especies vegetales como producto de partida para desarrollar nuevos fármacos, por tanto, la ciencia debe seguir enfocando sus estudios en el aislamiento, purificación e identificación de metabolitos o grupos de metabolitos que sean potencialmente útiles para tratar el cáncer.

CAPÍTULO 2. PLANTAS MEDICINALES COLOMBIANAS COMO FUENTE DE METABOLITOS BIOACTIVOS PARA TRATAR EL CÁNCER

Las plantas medicinales representan un importante recurso natural cuyo potencial biológico ha sido poco estudiado por la comunidad científica. En este capítulo de la tesis exploramos la flora Caribe Colombiana a través de la evaluación de la actividad anti-proliferativa de extractos etanólicos obtenidos de especies vegetales de la región, contra líneas de cáncer humano. Se evaluaron 31 extractos etanólicos obtenidos de 28 plantas de la región frente a seis (6) líneas de cáncer humano: A549 (Pulmón, ATCC® CCL-185™), H292 (Pulmón, ATCC® CRL-1848™), HT-29 (Colorrectal, ATCC® HTB-38™), PC-3 (Próstata, ATCC® CRL-1435™), MDA-MB-231 (Mama, ATCC® HTB-26™) y HeLa (Cervical, ATCC® CCL-2™). Adicionalmente, los extractos fueron evaluados en dos líneas de fibroblastos en representación de las células normales, 3T3-L1 (ATCC® CL-173™) y MRC-5 (ATCC® CCL-171™). Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo apropiado suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés) y mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

La actividad de los extractos sobre la proliferación celular fue determinada utilizando el ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual está basado en la transformación metabólica del MTT a cristales de formazán por células viables y la cuantificación del producto midiendo la OD_{550nm}. Para cada extracto se calculó el porcentaje de supervivencia relativo con respecto a un grupo de células control no tratadas y, posteriormente, mediante un análisis de regresión no lineal de las curvas concentración-respuesta; se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀ / IC₅₀:concentración del extracto que causa inhibición del crecimiento en el 50 % de la población celular) para aquellos extractos que mostraron actividad biológica promisoria (CI₅₀<100µg/mL), en función de los resultados se clasificaron de acuerdo a los criterios del NCI como Activo: CI₅₀<20 µg/mL, moderadamente activo: 20<CI₅₀<100 µg/mL e inactivo: CI₅₀>100 µg/mL [28,29]. Se observaron diferentes grados de actividad sobre las líneas celulares evaluadas por parte de los extractos en estudio, presentándose la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 como la más sensible al efecto de los extractos y HT-29 de cáncer colorrectal como la más resistente. En función de los resultados obtenidos, se calcularon los índices de selectividad, como la razón entre la CI₅₀ sobre los fibroblastos normales (3T3-L1 o MRC-5) y la CI₅₀ sobre la línea celular de adenocarcinoma.

Con base a estos resultados se realizó un fraccionamiento cromatográfico biodirigido del extracto más activo y selectivo (*B. simaruba*) y la actividad anti-proliferativa de las fracciones obtenidas fue evaluada aplicando la misma metodología y criterios de clasificación utilizados para los extractos totales. Para corroborar el efecto anti-proliferativo del extracto y las fracciones activas, se realizó un ensayo de clonogenicidad, método que convencionalmente se correlaciona con el ensayo de MTT. Conjuntamente, se realizó a los extractos y a las fracciones, un tamizaje fitoquímico preliminar que permitió observar grupos de metabolitos secundarios presentes (alcaloides, cumarinas, taninos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas). Teniendo en

cuenta el comportamiento epidemiológico del cáncer y, observando que el cáncer de pulmón es el que causa un número mayor de muertes a nivel mundial, se profundizó en el estudio del efecto anti-proliferativo de algunos extractos sobre las líneas de cáncer de pulmón, evaluando la actividad sobre las líneas celulares A549 y H292.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa de la tesis, generaron dos (2) artículos científicos y fueron divulgados en eventos académicos de carácter nacional e internacional.

Adicionalmente, estos resultados permitieron identificar una fracción enriquecida en ésteres de sacarosa obtenida de los cálices de *Physalis angulata*, cuyo estudio específico profundo generó un proyecto de investigación financiado por Colciencias hoy MinCiencias, los resultados se presentan en el capítulo 3 de este documento.

1. *Identification of Colombian Caribbean species with potential antiproliferative activity against several types of cancer cell lines - Identificación de especies vegetales de la Costa Caribe Colombiana con potencial actividad anti-proliferativa sobre diversos tipos celulares de cáncer*

Daneiva Caro[#], Laura Ospina[#], Santiago Bolívar, Yanet Ocampo, Rubén Salas, Fredyc Díaz, Fabio Aristizábal, Luis A. Franco^{*}.

[#]*Ambos se consideran primeros autores*

^{*}*Autor de correspondencia*

En revisión por los autores y escogencia de revista para publicación.

Resumen:

El cáncer es un grave problema mundial de salud pública que fue responsable de 9'958.133 millones de muertes en 2020. Si bien se dispone de un manejo farmacológico, sus efectos secundarios y elevado costo, impactan negativamente en la calidad de vida de las pacientes. Colombia es un país con biodiversidad y su flora se ha utilizado para aliviar enfermedades, incluido el cáncer. En este estudio, exploramos el efecto inhibitorio de 31 extractos etanólicos totales de plantas de la medicina tradicional del Caribe Colombiano, contra células de varios tipos de cáncer, empleando el ensayo de MTT. El fraccionamiento líquido-líquido del extracto más activo y selectivo (*B. simaruba*: $CI_{50} = 4.97 \mu\text{g/mL}$; $IS = 32.51$), llevó a la obtención de cuatro fracciones mayores identificadas como Bs-F001 a Bs-F004, las cuales fueron evaluadas mediante ensayo de MTT y de clonogenicidad sobre la línea de adenocarcinoma que mostró mayor sensibilidad (MDA-MB-231). Los resultados de esta evaluación mostraron que la actividad biológica se mantiene principalmente en la fracción de diclorometano (Bs-F002), que presentó un contenido elevado de triterpenos y esteroides. En conclusión, este estudio reveló extractos de plantas medicinales de la Costa Caribe Colombiana que podrían representar una valiosa fuente de metabolitos activos para tratar el cáncer; con especial énfasis en el extracto y las fracciones de *B. simaruba*, que exhiben una destacada actividad anti-proliferativa y posee compuestos reconocidos por su actividad anticancerígena, como los terpenoides y esteroides.

Introducción:

El cáncer agrupa a una familia de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y diseminación anormal de células con defectos en los procesos regulatorios que controlan la proliferación, homeostasis y muerte celular programada [4,29]. Actualmente, esta patología ocupó el primer y segundo lugar como causa de muerte principal en 112 países posicionándolo como un grave problema de salud pública que en el año 2020 llegó a cobrar la vida de 9'958.133 millones de personas en el mundo, siendo el pulmonar el más mortal (1'796.144 – equivalente al 18% del total de muertes por la patología), seguido del colorrectal (915.880 – 9.2%), hepático (830.180 – 8.3%), estomacal (768.793 – 7.7%) y el de mama (684.996 – 6.9%) [5]. A pesar que existen tratamientos disponibles como la extracción

quirúrgica total o parcial del tejido afectado, irradiación de zonas tumorales, aplicación de antineoplásicos e inmunoterapias, estos no siempre son efectivos y ocasionan en el paciente efectos adversos no deseados que afectan la calidad de vida del paciente comprometiendo la adherencia a los tratamientos. Adicionalmente, la resistencia que han desarrollado ciertas células cancerígenas hacia muchos de los tratamientos ha obligado al personal de la salud a utilizar dosis superiores a las convencionales para destruir las células anormales, aumentando aún más la incidencia de efectos adversos asociados a la toxicidad de estos fármacos [14,17,18]. En este contexto se hace evidente la importancia de generar investigaciones relacionadas con el descubrimiento de nuevas fuentes proveedoras de nuevas moléculas que enriquezcan al conglomerado de alternativas terapéuticas disponibles y, en este punto, el conocimiento etnofarmacológico de plantas medicinales es fundamental, ya que estas, a lo largo de la historia, han sido generadoras de fármacos que actualmente hacen parte de la terapia contra el cáncer, tales como los alcaloides vinblastina y vincristina (*C. roseus* – antes *V. rosea*), derivados semi-sintéticos etopósido y tenipósido (*P. peltatum*), topotecán e irinotecán (*C. acuminata*), paclitaxel y sus derivados (*T. brevifolia*), entre otros [23,25,26]. Colombia es un país dotado de una gran cantidad de recursos naturales que podrían usarse para descubrir nuevas moléculas potencialmente útiles para atacar las células cancerosas sin las dificultades asociadas con la terapia actual. En este estudio se evaluó el efecto anti-proliferativo de 31 extractos obtenidos de diferentes órganos de 29 plantas medicinales de la Costa Caribe colombiana, frente a un panel de líneas celulares de adenocarcinoma y dos líneas fibroblastos normales (3T3-L1 o MRC-5) utilizando el método de MTT y ensayo de clonogenicidad.

Materiales y métodos:

Recolección del material vegetal, Obtención de extractos y Fraccionamiento biodirigido: el material vegetal consistente en hojas, semillas, frutos o flores de las 29 especies con reporte previo de uso en la medicina popular colombiana [30,31] fueron recolectados en diferentes en diferentes municipios de la jurisdicción de CARDIQUE, de acuerdo al permiso recolección de especies vegetales emitido por la Corporación Autónoma Regional del Canal del Dique según Resolución 0751 (27 JUN 2014). Una muestra testigo (voucher) de cada planta se envió al Herbario Nacional de Colombia (COL - Bogotá, Colombia) o al Jardín Botánico “Guillermo Piñeres” (JBC - Turbaco, Colombia) para su identificación taxonómica. Posteriormente, el material vegetal recolectado (entre 2-10 Kg, aproximadamente), se secó a temperatura ambiente (25-30°C), se redujo a polvo a través de un proceso de molienda y, se sometió a maceración con etanol 96% grado USP (ETALMAG, Colombia) hasta agotamiento. El extracto obtenido fue filtrado (Whatman, GE Healthcare, China) y concentrado a presión reducida y temperatura constante hasta sequedad utilizando un rotaevaporador (Heidolph, Alemania). Los extractos concentrados se pesaron y se calculó el rendimiento del proceso como la relación entre la cantidad de material vegetal seco y la cantidad de extracto obtenido (**Tabla 1**). El extracto que mostró mayor actividad biológica y mayor valor de índice de selectividad fue escogido para su fraccionamiento mediante partición líquido-líquido con solventes de distintas polaridades (hexano, diclorometano y metanol) (Fisher Scientific, USA).

Tamizaje preliminar fitoquímico: con el propósito de identificar los grupos de metabolitos secundarios que podrían conferir la actividad biológica a los extractos y fracciones, se realizaron pruebas cualitativas que indicaron presencia o ausencia de alcaloides, cumarinas, taninos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas; siguiendo protocolos estándares previamente reportados por [32].

Tabla 1. Plantas medicinales de la Costa Caribe Colombiana incluidas en el estudio.

No.	Nombre científico	Familia	Nombre común	Uso tradicional	Voucher No.	Órgano	Rendimiento (p/p%)
1	<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Balsamina	Antiparasitario	JBC 793	Hojas	9.83
2	<i>Piper peltatum</i> L.	Piperaceae	Santa María	Trastornos de la piel	JBC 1438	Hojas	4.20
3	<i>Ruellia tuberosa</i> L.	Acanthaceae	Campana	Anti-inflamatorio	JBC 3932	Hojas	6.0
4	<i>Sarcostemma clausum</i> (Jacq.) Schult.	Apocynaceae	Bejuco de Sapo	Trastornos gastrointestinales	JBC 2502	Hojas	7.31
5	<i>Sterculia apetala</i> (Jacq.) H. Karst.	Malvaceae	Camajuro	Trastornos respiratorios	COL 538417	Semillas	7.80
6	<i>Tabebuia ochracea</i> (Cham.) Standl.	Bignoniaceae	Polvillo	Anti-inflamatorio	JBC 5153	Corteza	6.80
7	<i>Tabernaemontana cymosa</i> Jacq.	Apocynaceae	Bola de Puerco	Anti-diarreico	JBC 3243	Semillas	9.61
8	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) Merr.	Apocynaceae	Cavalonga	Anti-diarreico, Antimicrobiano	JBC 66	Flores	7.39
9	<i>Trichilia hirta</i> L.	Meliaceae	Jobo Macho	Insecticida	JBC 4330	Semillas	7.86
10	<i>Croton malambo</i> H. Karst.	Euphorbiaceae	Malambo	Reumatismo, Anti-diarreico,	JBC 1438	Corteza	7.08
11	<i>Capparis odoratissima</i> Jacq.	Capparaceae	Olivo	Trastornos de la piel	JBC 1492	Hojas	7.61
12	<i>Hyptis capitata</i> Jacq.	Lamiaceae	Boton Negro	Trastornos de la piel	JBC 1389	Hojas	10.43
13	<i>Murraya exotica</i> L.	Rutaceae	Azahar de la India	Dolor de muela	COL 538418	Hojas	9.83
14	<i>Diospyros inconstans</i> Jacq.	Ebenaceae	Caimitillo	Trastornos de la piel	JBC 1438	Hojas	10.17
15	<i>Cecropia peltata</i> L.	Urticaceae	Guarumo/Yarumo	Diurético	JBC 1383	Hojas	7.80
16	<i>Bursera graveolens</i> (Kunth)	Burseraceae	Caraña	Reumatismo	JBC 5115	Corteza	7.93
17	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	Burseraceae	Almácigo	Anti-inflamatorio	JBC 4458	Corteza	6.50
18	<i>Caesalpinia coriaria</i> (Jacq.) Willd.	Fabaceae Lindl.	Divi-divi	Antimicrobiano	COL 538422	Fruto	8.20
19	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Amaranthaceae	Paico/Hierba Santa	Antiparasitario	JBC 4005	Hojas	9.38
20	<i>Crotalaria retusa</i> L.	Fabaceae	Cascabel	Antimicrobiano	JBC12007	Semillas	8.70
21	<i>Eryngium foetidum</i> L.	Apiaceae	Culantro	Anti-inflamatorio	COL 538419	Hojas	8.79
22	<i>Gustavia superba</i> (Kunth) O.Berg.	Lecythidaceae	Membrillo	Trastornos respiratorios	JBC 1382	Hojas	6.80
22	<i>Hippomane mancinella</i> L.	Euphorbiaceae Juss.	Manzanillo	Diurético	JBC 2478	Hojas	6.70
23						Frutos	5.40
23						Semillas	8.70
24	<i>Hura crepitans</i> L.	Euphorbiaceae	Ceiba Blanca	Antiviral	JBC 788	Corteza	7.20
25	<i>Inga vera</i> Willd.	Fabaceae	Guama	Laxante	JBC 17149	Semillas	8.10
26	<i>Mammea americana</i> L.	Calophyllaceae J. Agardh	Mamey	Antimicrobiano	JBC 467	Semillas	11.34
27	<i>Ambrosia cumanensis</i> Kunth	Asteraceae Bercht. & J. Presl	Artemisa	Antiparasitario	COL 538448	Hojas	5.80
28	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Marañón	Diabetes	JBC 4431	Semillas	7.50
29	<i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poit.	Euphorbiaceae	Pitamorreal	Anti-inflamatorio	JBC1018	Hojas	8.06

Uso tradicional tomado de [30] y los rendimientos de los extractos listados del 1 al 15 fueron tomados de [33]

Fotografías de todas las especies vegetales estudiadas se encuentran disponibles en TRAMIL web site: <http://www.tramil.net/es>. [31]

Preparación de muestras para evaluación biológica: muestras de los extractos secos fueron pesadas y disueltas en etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, USA) a fin de obtener soluciones stock que fueron disueltas en el medio de cultivo para las pruebas biológicas a la concentración establecida (100 µg/mL) según los estándares del National Cancer Institute (NCI) [28,29,34]. Estas se almacenaron en pequeñas alícuotas (40 µL) a -20°C. En todas las pruebas, el porcentaje de solvente no superó el 1% v/v.

Mantenimiento de los cultivos celulares: se realizaron los experimentos utilizando líneas celulares obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, USA). Se adquirieron cuatro (4) líneas de cáncer humano: HT-29 (Colorrectal, HTB-38™), PC-3 (Próstata, CRL-1435™), MDA-MB-231 (Mama, HTB-26™), HeLa (Cervical, CCL-2™) y dos (2) líneas de fibroblastos en representación de las células normales, 3T3-L1 (CL-173™) y MRC-5 (CCL-171™). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en frascos de poliestireno tratado de 25 cm² que contenía medio de cultivo apropiado para cada línea (según las recomendaciones de la ATCC), suplementado con 10% de FBS y, mantenidos en incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂ (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Ensayo de MTT: para evaluación de la actividad anti-proliferativa se utilizó el método de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) descrito previamente por [35]. Las células fueron cultivadas en placas estériles de 96 pozos colocando entre 5.000 – 15.000 células/mL en cada pozo dependiendo el tipo y tamaño celular y se incubaron por 24 horas, para luego ser tratadas con soluciones de los extractos (0-100 µg/mL) por un periodo de 48 horas. Posteriormente, el medio se removió y se reemplazó por una solución de 0.25 mg/mL de MTT (Calbiochem, La Jolla, USA) que se dejó incubando por 4 horas. Trascurrido este tiempo, los cristales de formazán que se formaron se disolvieron en DMSO y se midió OD_{550 nm} de cada pozo usando un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific, Rockford, USA). La inhibición del crecimiento celular se expresó como porcentaje de células viables en las muestras tratadas en comparación con las células tratadas con vehículo. Los valores de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀, concentración del extracto que causa inhibición del crecimiento en el 50% de la población celular) se calcularon para los extractos que mostraron una actividad biológica promisoriosa (CI₅₀<100 µg/mL) y se clasificaron según los criterios del NCI según lo reportado por [29].

Cálculo de índice de selectividad (IS): El IS se calculó para los extractos que mostraron inhibir el crecimiento celular. Para ello, se evaluó el efecto de los extractos sobre el crecimiento de los fibroblastos 3T3-L1 y MRC-5 como representación de células normales empleando el método del MTT y posterior cálculo de la CI₅₀ tal como se describió previamente. El IS se calculó como la relación de la CI_{50 3T3-L1} o CI_{50 MRC-5} sobre la CI_{50 célula de cáncer} [36].

Ensayo de clonogenicidad: los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos descritos por [37] y [38]. Células MDA-MB-231 (más sensible) se cultivaron en placas de 6 pozos (500 células/pozo) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ permitiendo su adhesión por un periodo de 4 horas. Luego, se trataron con vehículo (DMSO), doxorrubicina (0.2 µg/mL) el extracto más activo y selectivo (CI_{50 B. simaruba}) y sus fracciones activas (Bs-F001 – Bs F003) y se incubaron las placas nuevamente por un periodo de 48 horas. Posteriormente, el medio fue removido, reemplazado por medio de cultivo suplementado y se dejaron formar las colonias

por un periodo de 12 días. Finalmente, las colonias fueron fijadas con ácido acético/metanol 1:7 (v/v), teñidas con cristal violeta 0.5% (Merck, Darmstadt, Germany) y contadas empleando un estereomicroscopio Leica EZ4 HD (Leica Microsystems, Singapore). Se consideró como una colonia un grupo conformado por mínimo 50 células.

Análisis estadístico de los datos: los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (EEM) de al menos dos experimentos independientes. Los valores de CI_{50} fueron calculados usando regresión no lineal y expresados como la media y el intervalo de confianza (IC). $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados y discusión:

Desde 1959 ha ido creciendo el interés en el estudio de las plantas como fuente de compuestos anticancerígenos, lo que ha dado como resultado la obtención de una variedad de moléculas que hacen parte del arsenal terapéutico disponible para tratar el cáncer. Hoy en día, esta práctica se mantiene y ha ganado popularidad ya que un alto porcentaje de la población mundial usa plantas para prevenir el cáncer, evitar recaídas o metástasis, reforzar el sistema inmunológico y reducir los efectos secundarios resultantes de la quimioterapia y la radioterapia [14,39]. En consecuencia, la investigación en este campo es necesaria no solo para identificar plantas con potencial como tratamiento contra el cáncer, sino también para prevenir el empleo de plantas que carecen de bioactividad. En Colombia se utiliza tradicionalmente una gran cantidad de plantas para tratar diferentes enfermedades, pero sus propiedades farmacológicas están inexploradas. En este trabajo se evaluaron extractos etanólicos obtenidos de plantas medicinales empleadas por la población de la Costa Caribe Colombiana para tratar diferentes desórdenes de salud. De las 29 especies recolectadas se obtuvieron 31 extractos totales con rendimientos superiores al 4% (**Tabla 1**). Los resultados del tamizaje fitoquímico preliminar se muestran en la **Tabla 2**, en donde se evidencia el contenido diverso de metabolitos secundarios en cada una de las especies, incluso entre órganos de la misma planta, como es el caso de la especie *H. mancinella* de la cual se estudiaron tres órganos (hojas, frutos y semillas) pero solo el extracto de hojas mostró actividad, demostrando que diferencias en el tipo y proporción de metabolitos afectan significativamente la actividad biológica.

En los bioensayos, todas las líneas celulares fueron sensibles al tratamiento con los extractos de *T. hirta*, *B. simaruba*, *M. americana*, *T. peruviana*, *T. cymosa*, *A. cumanensis* y *A. occidentale*, siendo los cuatro primeros los que mostraron una mayor actividad biológica, clasificándose como activos ($CI_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$) según los criterios del NCI [28] (**Tabla 3**). La línea celular que mostró una mayor sensibilidad al efecto de los extractos fue MDA-MB-231 (**Tabla 3**). Esta línea celular es ampliamente empleada en investigación contra el cáncer de mama por ser un modelo de células malignas que no expresan receptores de estrógenos, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano (tipo triple negativo), simulando uno de los tipos de cáncer más agresivo y con pobre supervivencia debido a la falta de terapias eficaces [40,41]. Nuestros resultados indican que los extractos anteriormente mencionados constituyen una interesante fuente de moléculas bioactivas que conviene estudiar para obtener nuevas terapias farmacológicas contra el cáncer de mama.

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico preliminar de las especies vegetales estudiadas

No.	Extracto	Alc			Cum	Tan		GC			Fla		Sap		Tri/est		Qui
		D	M	W	B	Fe	GS	K	R	KK	Sh	Ci	Es	VS	LB	SW	BO
1	<i>M. charantia</i>	++	++	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
2	<i>P. peltatum</i>	+	+	-	-	++	+++	+	+	+	+++	++	+	+	++	+	+
3	<i>R. tuberosa</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	++	++	++	++	+
4	<i>S. clausum</i>	-	-	-	-	-	-	++	+	+	++	+	-	-	-	-	+
5	<i>S. apetala</i>	++	++	+	+++	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
6	<i>T. ochracea</i>	-	-	-	-	++	+	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+++
7	<i>T. cymosa</i>	++	++	+	-	-	-	++	++	+	+++	++	+++	++	+++	++	++
8	<i>T. peruviana</i>	-	-	-	-	-	-	++	+	-	++	+	-	-	-	-	+
9	<i>T. hirta</i>	++	+	+	+	-	-	+	-	+	+++	++	++	+	++	+	-
10	<i>C. malambo</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	++	++	-	-	++	++	-
11	<i>C. odoratissima</i>	+	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-
12	<i>H. capitata</i>	-	+	+	++	++	-	-	*	+	-	-	+	*	+	-	-
13	<i>M. exotica</i>	+++	++	-	+++	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	++	-
14	<i>D. inconstans</i>	+	+	+	+	+	++	-	-	-	-	-	+++	++	++	++	-
15	<i>C. peltata</i>	++	++	++	-	++	++	+	-	+	++	+	++	++	+++	+++	+
16	<i>B. graveolens</i>	-	-	-	+++	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	-	++
17	<i>B. simaruba</i>	++	+	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	++	++	++	+
18	<i>C. coriaria</i>	-	-	-	-	+++	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	+
19	<i>C. ambrosioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
20	<i>C. retusa</i>	++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+	-	-	-
21	<i>E. foetidum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++
22	<i>G. superba</i>	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
23	<i>H. mancinella-H</i>	++	+	++	+	+++	++	+++	+	-	++	++	-	-	+	+	-
24	<i>H. mancinella-F</i>	-	-	-	+	-	-	-	*	-	-	-	+	*	+	+	-
25	<i>H. mancinella-S</i>	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+++	++	-	-	-	-	+
26	<i>H. crepitans</i>	++	++	+	+++	+++	++	+	+	+	++	++	-	-	-	-	+++
27	<i>I. vera</i>	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
28	<i>M. americana</i>	-	-	-	++	+	+	-	-	-	++	+	-	-	+	+	-
29	<i>A. cumanensis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	++	++	+
30	<i>A. occidentale</i>	-	-	-	++	++	+	-	-	-	+++	++	+++	++	++	+	-
31	<i>P. tithymaloides</i>	++	+	+	-	++	+++	++	+	+	+++	+++	-	-	-	-	+++

Las observaciones se clasificaron como muy presente (+++), presente (++) , ligeramente presente (+) y ausente (-). Convenciones: Alcaloides (Alc), Cumarinas (Cum), Taninos (Tan), Glicósidos cardiotónicos (Gc), Flavonoides (Fla), Saponinas (Sap), Triterpenos/esteroides (Tri/est), Quinonas (Qui); pruebas realizadas para la identificación de los metabolitos: D: Dragendorff, M: Mayer, W: Wagner, B: Baljet, Fe: Cloruro férrico, GS, Gelatina sal, K: Kedde, R: Raymond-Marthoud, Sh: Shinoda, Ci: Citrobórico, Es: Prueba de espuma, VS: Vainillina-ácido sulfúrico, LB: Liebermann-Buchard, SW: Salkowski y BO: Bornträger. *Prueba no realizada

La **Tabla 4.** muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad anti-proliferativa y los correspondientes IS de los extractos frente a las líneas 3T3-L1 y MRC-5. En este ensayo se evaluaron aquellos extractos que mostraron actividad biológica sobre alguna de las 6 líneas de adenocarcinoma. Los IS se expresaron como la razón entre la CI₅₀ sobre los fibroblastos normales (3T3-L1 o MRC-5) y la CI₅₀ de la línea de cáncer más sensible (MDA-MB-231). Los extractos que mostraron los mejores IS fueron *B. simaruba*, *T. peruviana* y *M. americana*, ya que superaron el valor mínimo de referencia sugerido por otros autores para la selección de extractos con potencial actividad antitumoral en valoraciones *in vitro* (IS>2) [42]. Este criterio es fundamental en la selección y estudio de nuevas terapias ya que indica que podrían ser bien toleradas con probablemente menos efectos secundarios en comparación con los fármacos convencionales.

Tabla 3. CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$ de los extractos activos en las diferentes líneas celulares evaluadas

No.	Extracto	HT-29	PC-3	MDA-MB-231	HeLa	Clasificación NCI
		CI_{50} $\mu\text{g/mL}$				
1	<i>M. charantia</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
2	<i>P. peltatum</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
3	<i>R. tuberosa</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
4	<i>S. clausum</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
5	<i>S. apetala</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
6	<i>T. ochracea</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
7	<i>T. cymosa</i>	63.10 (70.47-55.59)	55.72 (65.16-47.42)	38.37 (46.24-31.41)	54.70 (58.34-50.93)	Moderadamente activo
8	<i>T. peruviana</i>	31.48 (35.98-27.35)	7.01 (7.82-6.27)	9.44 (11.30-7.83)	26.30 (29.79-23.17)	Activo
9	<i>T. hirta</i>	19.50 (21.68-17.50)	10.84 (12.00-9.89)	7.71 (9.91-5.96)	5.85 (6.78-5.13)	Activo
10	<i>C. malambo</i>	>100.00	>100.00	63.68 (70.31-56.75)	87.70 (102.57-73.96)	Moderadamente activo
11	<i>C. odoratissima</i>	>100.00	>100.00	>100.00	59.16 (65.61-52.48)	Moderadamente activo
12	<i>H. capitata</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
13	<i>M. exotica</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
14	<i>D. inconstans</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
15	<i>C. peltata</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
16	<i>B. graveolens</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
17	<i>B. simaruba</i>	23.77 (28.91-19.36)	49.77 (59.16-40.93)	4.97 (6.00-4.07)	5.97 (7.41-4.70)	Activo
18	<i>C. coriaria</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
19	<i>C. ambrosioides</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
20	<i>C. retusa</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
21	<i>E. foetidum</i>	>100.00	>100.00	46.13 (55.85-37.33)	>100.00	Moderadamente activo
22	<i>G. superba</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
23	<i>H. mancinella-H)</i>	>100.00	>100.00	55.98 (76.21-40.09)	86.70 (99.54-74.65)	Moderadamente activo
24	<i>H. mancinella-F</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
25	<i>H. mancinella-S</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
26	<i>H. crepitans</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
27	<i>H. vera</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo
28	<i>M. americana</i>	16.29 (19.50-13.46)	30.69 (37.93-25.24)	9.62 (11.35-8.15)	6.89 (8.24-5.69)	Activo
29	<i>A. cumanensis</i>	37.07 (44.57-30.20)	53.21 (59.98-46.67)	15.07 (18.16-12.62)	37.07 (47.64-32.66)	Moderadamente activo
30	<i>A. occidentale</i>	57.54 (65.92)	38.90 (41.59-36.31)	46.56 (60.53-34.20)	55.85 (59.43-52.36)	Moderadamente activo
31	<i>P. tithymaloides</i>	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	Inactivo

Los resultados se expresaron como la media de CI_{50} y el IC. Los criterios NCI indican tres rangos de actividad: Activo ($CI_{50} < 20\mu\text{g/mL}$), Moderadamente activo ($20\mu\text{g/mL} < CI_{50} < 100\mu\text{g/mL}$) e Inactivo ($CI_{50} > 100\mu\text{g/mL}$) [28].

Tabla 4. CI₅₀ en µg/mL de los extractos activos sobre los fibroblastos y IS sobre MDA-MB-231

Línea celular	3T3-L1	IS	MRC-5	IS
Extracto	CI ₅₀ µg/mL (95% CI)	CI ₅₀ 3T3-L1/CI ₅₀ MDA-MB-231	CI ₅₀ µg/mL (95% CI)	CI ₅₀ MRC-5/CI ₅₀ MDA-MB-231
<i>T. cymosa</i>	52.48 (63.39-43.25)	1.4	72.11 (82.04-62.66)	1.9
<i>T. peruviana</i>	>200	>21.2	8.67 (11.51-6.67)	0.9
<i>T. hirta</i>	14.36 (17.06-12.08)	1.9	11.64 (13.46-10.12)	1.5
<i>C. malambo</i>	95.94 (106.17-85.90)	1.5	74.30 (85.51-64.42)	1.2
<i>B. simaruba</i>	161.44 (185.35-138.68)	32.5	95.06 (115.88-73.79)	19.1
<i>E. foetidum</i>	>200	>4.3	190.99 (218.27-165.20)	4.1
<i>H. mancinella-H</i>	105.68 (136.46-88.31)	1.9	120.23 (149.28-95.28)	2.1
<i>M. americana</i>	101.63 (119.12-86.50)	10.6	48.98 (68.55-35.81)	5.1
<i>A. cumanensis</i>	21.78 (23.55-20.18)	1.4	39.99 (44.06-36.14)	2.7
<i>A. occidentale</i>	70.96 (92.47-54.33)	1.5	64.57 (73.79-56.23)	1.2

*Prueba no realizada

De acuerdo a los valores de CI₅₀ sobre las líneas de adenocarcinoma y el IS, el extracto de *B. simaruba* fue considerado como el más activo y selectivo. Esta planta, es utilizada en la medicina tradicional para tratar inflamaciones, psoriasis, eccemas, quemaduras solares, erupciones cutáneas, llagas en la piel, infecciones internas, fiebres, resfriados y gripe [30,43,44]. Curiosamente, esta especie y otras pertenecientes a este mismo género tienen reportes de diversas actividades biológicas, incluyendo citotoxicidad, específicamente los extractos de *B. copallifera* mostraron actividad anti-proliferativa contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) [44–47]. El fraccionamiento bioguiado mediante partición líquido-líquido del extracto de *B. simaruba* condujo a la obtención de cuatro fracciones (Bs-F001 – Bs F004), cuya actividad biológica fue evaluada sobre la línea MDA-MB-231, 3T3-L1 y MRC-5 (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad biológica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de *B. simaruba*

Fracción	Solvente utilizado para la extracción	Rendimiento (p/p%)	MDA-MB-231 CI ₅₀ µg/mL (95% CI)	3T3-L1 CI ₅₀ µg/mL (95% CI)	IS	MRC-5 CI ₅₀ µg/mL (95% CI)	IS
Bs-F001	Hexano	16.67	8.61 (13.77-5.06)	16.40 (24.21-11.04)	1.9	10.07 (12.68-7.93)	1.2
Bs-F002	Diclorometano	16.99	0.13 (0.18-0.09)	10.81 (13.87-8.45)	83.2	8.85 (18.16-4.94)	68.1
Bs-F003	Metanol	18.79	1.17 (1.63-0.81)	12.11 (14.50-8.40)	10.4	3.57 (6.34-2.10)	3.05
Bs-F004	Metanol:agua	43.14	>50.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: no determinado

La actividad biológica frente a la línea MDA-MB-231 del extracto se conservó en las fracciones Bs-F001, Bs-F002 y Bs-F003 mientras que Bs-F004 fue inactiva. Además, las fracciones Bs-F002 y Bs-F003 mostraron una alta selectividad hacia la inhibición del crecimiento de las células MDA-MB-231. La elevada actividad y selectividad de Bs-F002 hacen que esta fracción sea reconocida como una fuente prometedora de nuevos compuestos anticancerígenos que debería explorarse más.

En este mismo sentido, el tamizaje fitoquímico cualitativo realizado a las fracciones activas reveló una distribución de alcaloides, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas del extracto de *B. simaruba* en las distintas fracciones, lo que podría explicar las diferencias encontradas en la actividad biológica (**Tabla 6**).

Tabla 6. Tamizaje preliminar cualitativo de las fracciones activas de *B. simaruba*

No.	Fracción	Alc	Cum	Tan	GC	Fla	Sap	Tri/est	Qui
1	Bs-F001	++	-	-	-	-	-	+++	-
2	Bs-F002	-	-	-	-	-	-	+++	-
3	Bs-F003	-	-	-	-	-	+++	-	-
Extracto (Fuente)		++	-	-	-	+	+++	+++	+

Las observaciones se clasificaron como fuertemente detectado (+++), detectado (++) , ligeramente detectado (+) y no detectado (-). Convenciones: Alcaloides (Alc), Cumarinas (Cum), Taninos (Tan), Glicósidos cardiotónicos (Gc), Flavonoides (Fla), Saponinas (Sap), Triterpenos/esteroides (Tri/est), Quinonas (Qui)

De manera consistente, nuestros resultados coinciden con estudios previos relacionados con la composición química de extractos obtenidos de diferentes órganos de *B. simaruba*, incluyendo la corteza, en donde reportan la identificación de terpenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos grasos de cadena larga (FA), ésteres metílicos de FA y sacarosa [48–50]. Otros metabolitos de importancia detectados tanto en el extracto como en las fracciones activas fueron saponinas, triterpenos y esteroides. Este tipo de metabolitos son reconocidos por sus efectos fisiológicos beneficiosos; por ejemplo, los triterpenoides son metabolitos distribuidos comúnmente por todo el reino vegetal en forma de triterpenoides libres, glicósidos de triterpeno (saponinas), fitoesteroides y sus precursores; y han sido estudiados en cuanto a efectos anti-inflamatorios, hepatoprotectores, analgésicos, antimicrobianos, antimicóticos, viroestáticos, inmunomoduladores, anti-proliferativos y pro-apoptóticos en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* [45,51,52]. Considerando que la evaluación del efecto citotóxico mediante métodos colorimétricos puede ser afectada por diversos factores incluyendo la posible interacción de las sustancias de prueba con el reactivo para la medición, los efectos citotóxicos intrínsecos del MTT o que algunos solventes puedan afectar células en algún momento durante el experimento, a menudo se emplean ensayos complementarios como el ensayo de clonogenicidad como método alternativo [53]. En este orden de ideas y con el objeto de confirmar el efecto anti-proliferativo del extracto y las fracciones activas (Bs-F001 – Bs F003), se realizó el ensayo de clonogenicidad o ensayo de formación de colonias, útil en farmacología y toxicología para evaluar los efectos de tratamientos físicos (radiación UV) o químicos (sustancias citotóxicas) sobre la capacidad de división y formación de colonias a partir de una sola célula expuesta a un determinado tratamiento. Este ensayo posee grandes ventajas tales como bajo costo, reproducibilidad, sencillez, y rapidez para la selección de nuevos agentes quimioterapéuticos, además de poseer una buena correlación con el ensayo de MTT para tamizajes a escala moderada [37,38]. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 1**, en donde se aprecia que las células MDA-MB-231 tratadas solo con el vehículo produjo un gran número de colonias (310 ± 11), mientras que el tratamiento con el extracto y las fracciones activas suprimieron la capacidad de formación de colonias de la línea celular de adenocarcinoma de mama, de manera similar al efecto producido por la doxorubicina usada como fármaco de referencia.

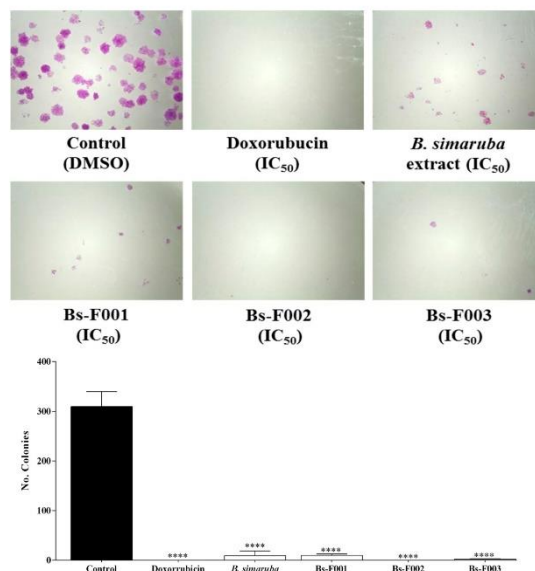


Figura 1. Efecto del extracto de *B. simaruba* y sus fracciones activas sobre la capacidad formadora de colonias de células MDA-MB-231. Fotografías representativas de las colonias formadas luego de la exposición a los tratamientos (aumento 8X). Los resultados están expresados como la media \pm E.E.M. de al menos 2 experimentos independientes. **** $P < 0.0001$ comparado con el grupo control (DMSO).

Nuestro estudio demuestra que la búsqueda de alternativas terapéuticas utilizando como materia prima extractos de plantas medicinales sigue siendo una herramienta importante para investigar y descubrir nuevas moléculas de origen natural potencialmente útiles contra el cáncer. A partir de nuestros datos, el extracto de *B. simaruba* y sus fracciones se presentan como una alternativa prometedora que vale la pena continuar estudiando con el fin de definir la identidad química de sus constituyentes y determinar los efectos biológicos en modelos más complejos que permitan determinar los posibles mecanismos de acción involucrados en su actividad.

Conclusión:

El estudio exploratorio de la flora de la Costa Caribe Colombiana fundamentado en el conocimiento etnofarmacológico existente condujo a la identificación de once extractos vegetales clasificados como activos o moderadamente activos frente a varias líneas celulares de cáncer. Resaltándose el extracto de *B. simaruba* como el más activo y selectivo de la serie. Así, iniciamos su fraccionamiento y establecimos que varias fracciones (BS-F001 a BS-F003) conservaban la bioactividad del extracto parental, así como la presencia de metabolitos con reconocida actividad biológica, particularmente propiedades anticancerígenas. Se recomienda realizar más estudios con el fin de aislar, purificar e identificar compuestos presentes en la fracción Bs-F002, así como elucidar los mecanismos de acción involucrados en su citotoxicidad.

Agradecimientos y fuentes de financiación: Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena y MinCiencias por el apoyo financiero (Proyecto 591-2013 y Convocatoria 647-2014). Los autores también agradecen a Antonio Angulo y Karen Jiménez por su apoyo técnico en la obtención de los extractos.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no presentan conflicto de interés.

Contribuciones de los autores: L. Franco, R. Salas y F. Díaz concibieron y diseñaron el estudio. S. Bolívar obtuvo y caracterizó los extractos totales de las especies en estudio, F. Aristizábal proporcionó asesoría y apoyo para el desarrollo de los ensayos biológicos, D. Caro L. Ospina y Y. Ocampo realizaron los ensayos de actividad biológica. D. Caro y Y. Ocampo redactaron el primer borrador del artículo. R. Salas, F. Aristizábal, Y. Ocampo y L. Franco revisaron el documento y todos los autores aprobaron el manuscrito final.

2. *Colombian Caribbean extracts with anti-proliferative activity against lung cancer cell lines - Extractos del Caribe Colombiano con actividad anti-proliferativa frente a líneas celulares de cáncer de pulmón*

Caro Fuentes, D., Ocampo Buendía, Y., Ospina Mateus, L., Salas Díaz, R., Díaz Castillo, F., & Franco Ospina, L. *Revista Cubana de Farmacia* 2019, 51 (4). <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/283>.

Resumen

Introducción: El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer con mayor impacto sobre la población. Debido a las limitaciones de las terapias convencionales tales como su poca selectividad, las reacciones adversas y la resistencia que tiene, se hace necesaria la búsqueda de nuevos metabolitos activos, tomando a las plantas medicinales como fuentes promisorias a explorar.

Objetivo: Evaluar la actividad anti-proliferativa de 15 extractos vegetales obtenidos de plantas medicinales del Caribe Colombiano, frente a las líneas celulares de cáncer de pulmón A549 y H292.

Métodos: La actividad biológica de los extractos etanólicos totales se evaluó mediante el empleo del método colorimétrico de reducción del MTT y el ensayo de clonogenicidad. Como primer paso, se determinó la viabilidad celular y se calculó la CI_{50} . Para los extractos activos, se evaluó posteriormente el efecto sobre la formación de colonias en células H292, la cual fue la línea celular más sensible al efecto de los extractos.

Resultados: Los extractos de *C. malambo*, *C. odoratissima*, *M. charantia*, *T. cymosa*, *T. hirta* y *T. peruviana* inhibieron significativamente la viabilidad ($CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) y la capacidad de formación de colonias de las células de cáncer de pulmón. *T. cymosa*, *T. hirta* y *T. peruviana*. Se destacaron como las especies más activas.

Conclusiones: De los 15 extractos evaluados, seis presentan un efecto anti-proliferativo en las líneas celulares de cáncer pulmonar. Por tanto, estas especies vegetales del Caribe Colombiano constituyen una fuente promisoriosa de metabolitos secundarios activos potencialmente útiles para el tratamiento del cáncer de pulmón, patología que presenta elevadas tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad a nivel mundial.

Palabras clave: Supervivencia Celular; Extractos Vegetales; Neoplasias Pulmonares; Línea Celular.

Abstract

Introduction: Lung cancer is a type of cancer with high impact on the population. Due to limitations on conventional therapies (low selectivity, secondary effects and resistance), it is necessary to focus scientific research on the search of new active metabolites, with medicinal plants as a promising source to explore.

Objective: To evaluate the anti-proliferative activity of 15 plant extracts obtained from medicinal plants from the Colombian Caribbean against lung cancer cell lines (A549 and H292)

Methods: The biological activity of the total ethanolic extracts was evaluated with the MTT reduction colorimetric method and clonogenic assay. Firstly, the cell viability was determined and the IC₅₀ calculated, later the effect of the extracts on the colony formation was evaluated on H292 cells, which was the cell line most susceptible to the treatment with the extracts.

Results: The extracts of *C. malambo*, *C. odoratissima*, *M. charantia*, *T. cymosa*, *T. hirta* and *T. peruviana* significantly inhibited the cell viability (IC₅₀<100 µg/mL) and the formation of lung cancer cell colonies, with *T. cymosa*, *T. hirta* and *T. peruviana* being highlighted as the most active species

Conclusions: The anti-proliferative effect of extracts obtained from six plant species of the Colombian Caribbean coast was evidenced, which are constitute a promising source of secondary metabolites potentially useful for treatment of lung cancer, pathology with high rates of incidence, prevalence and mortality worldwide.

Keywords: cell survival; plant extracts; lung neoplasms; cell line.

Introducción

El cáncer es una patología que involucra un proceso de crecimiento tisular y proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, que puede iniciarse en cualquier lugar del cuerpo humano¹[54]. En el año 2012, se presentaron 14 millones de casos y en 2015 ocurrieron 8,8 millones de defunciones atribuidas a este diagnóstico, cuya causa de mortalidad ocupa el segundo lugar después de las enfermedades cardiovasculares¹[54]. En cuanto a las tipologías, el cáncer de pulmón ocasiona el mayor número de muertes (1,69 millones de defunciones en 2015) y se clasifica como enfermedad de mal pronóstico con tasas de supervivencia relativa muy bajas, en comparación con otros tipos de cáncer¹[54]. Colombia no está exenta de esta problemática y, de acuerdo a lo reportado por el Observatorio Nacional de Cáncer (ONC Colombia), este grave problema de salud pública cobra la vida del 12.3% de los pacientes diagnosticados con cáncer cada año²[55]. Entre las principales alternativas disponibles para el tratamiento del cáncer de pulmón se encuentran la cirugía, la radioterapia y quimioterapia, las cuales disminuyen los signos y síntomas de la enfermedad y prolongan la vida de los pacientes. Sin embargo, la adherencia a la quimioterapia -por lo general- es baja debido a la elevada toxicidad y a la poca selectividad de los fármacos utilizados, que no solo afectan el crecimiento y propagación de las células cancerosas, sino también el de las células normales, con consecuentes efectos secundarios que deterioran la calidad de vida del paciente. Adicionalmente, es frecuente la presencia de células cancerosas resistentes al tratamiento. Esta conduce al aumento de la dosificación y al incremento consecuente de la frecuencia y severidad de los eventos adversos, los cuales afectan negativamente la relación riesgo-beneficio del tratamiento^{3,4}[6,56]. Esta problemática mantiene constante la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología, en donde los productos naturales representan una de las principales fuentes de nuevos agentes, más potentes y con menores

efectos adversos, que permitan combatir esta afección de alto impacto social y económico. Entre estos, las plantas medicinales han sido la base para muchos tratamientos farmacológicos y continúan siendo una de las opciones más populares para la prevención del cáncer a nivel global^{5,6}[27,57]. Colombia se encuentra catalogado entre los países considerados megadiversos. Sin embargo, un elevado porcentaje de las especies existentes no han sido estudiadas, por lo que existe una alta probabilidad de encontrar en ellas metabolitos potencialmente activos para la prevención y/o tratamiento del cáncer⁷ [58]. En este trabajo, se propuso evaluar la actividad anti-proliferativa de 15 extractos vegetales obtenidos de plantas medicinales del Caribe Colombiano, frente a dos líneas celulares de cáncer de pulmón: NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide) y A549 (adenocarcinoma pulmonar), al utilizar el método colorimétrico de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y el ensayo de clonogenicidad.

Métodos

Material vegetal y preparación de extractos: el material vegetal fue recolectado en diferentes municipios de la Costa Caribe Colombiana. Muestras testigos de las 15 especies vegetales se depositaron en las colecciones del Jardín Botánico "Guillermo Piñeres", de la ciudad de Cartagena (JBC) y en el Herbario Nacional Colombiano (COL). (**tabla 1**). El material vegetal se secó a temperatura ambiente, se pesó -reducido a polvo por molienda- y se sometió a maceración en frío con etanol al 96% hasta agotamiento. El extracto obtenido se filtró y concentró a presión reducida en un rotaevaporador (Heidolph, Alemania). El rendimiento del proceso fue determinado a partir del material vegetal seco.

Tabla 1. Información general de las especies vegetales incluidas en el estudio, rendimiento del proceso de extracción y solvente utilizado para la evaluación de la actividad biológica.

Nombre Científico	Familia	Nombre Común	Órgano	No. Voucher	Rendimiento (%)	Solvente Solubilización
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Balsamina	Hojas	JBC 793	9,83	DMSO
<i>Piper peltatum</i> L.	Piperaceae	Santa María	Hojas	JBC 1438	4,20	DMSO
<i>Ruellia tuberosa</i> L.	Acanthaceae	Campana	Hojas	JBC 3932	6,80	DMSO
<i>Sarcostemma clausum</i> (Jacq.) Schult.	Apocynaceae	Bejuco de Sapo	Hojas	JBC 2502	7,31	DMSO
<i>Sterculia apetala</i> (Jacq.) H. Karst.	Malvaceae	Camajuro	Semillas	COL 538417	7,80	DMSO
<i>Tabebuia ochracea</i> (Cham.) Standl.	Bignoniaceae	Polvillo	Corteza	JBC 5153	6,80	DMSO
<i>Tabernaemontana cymosa</i> Jacq.	Apocynaceae	Bola de Puerco	Semillas	JBC 3243	9,61	DMSO
<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) Merr.	Apocynaceae	Cavalonga	Flores	JBC 66	7,39	DMSO
<i>Trichilia hirta</i> L.	Meliaceae	Jobo Macho	Semillas	JBC 4330	7,86	DMSO
<i>Croton malambo</i> H. Karst.	Euphorbiaceae	Malambo	Corteza	JBC 1438	7,08	DMSO
<i>Capparis odoratissima</i> Jacq.	Capparaceae	Olivo	Hojas	JBC 1492	7,61	Etanol
<i>Hyptis capitata</i> Jacq.	Lamiaceae	Botón Negro	Hojas	JBC 1389	10,43	Etanol
<i>Murraya exotica</i> L.	Rutaceae	Azahar de la India	Hojas	COL 538418	9,83	Etanol
<i>Diospyros inconstans</i> Jacq.	Ebenaceae	Caimitillo	Hojas	JBC 1438	10,17	DMSO
<i>Cecropia peltata</i> L.	Urticaceae	Guarumo Yarumo	Hojas	JBC 1383	7,80	DMSO/Etanol

Tamizaje preliminar fitoquímico: con el objeto de identificar los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos totales evaluados, se realizaron pruebas para la detección de alcaloides, cumarinas, taninos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas. Se utilizó la metodología validada por Herrera y otros⁸[32].

Cultivos celulares: el efecto anti-proliferativo de los extractos totales de las especies en estudio, se evaluó frente a las líneas celulares de carcinoma pulmonar H292 (CRL-1848TM) y A549 (CCL-185TM), obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC®). Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), suplementado con 10% de suero bovino fetal, e incubadas a 37°C, atmósfera al 5% CO₂ y humedad relativa del 100%.

Actividad citotóxica: las células se cultivaron en placas de 96 pozos estériles por 24 horas y se trataron con diluciones seriadas de los extractos totales en estudio (0-100 mg/mL), fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), etanol o mezclas de estos solventes (**tabla 1**), e incubadas durante 48 horas. La inhibición del crecimiento celular se evaluó mediante el empleo del método colorimétrico, descrito por Mosmann en 1983⁹[35]. Este se basa en la determinación de la reducción por células metabólicamente activas del MTT (amarillo) a cristales de formazán (púrpura) midiendo la absorbancia a 550 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado y en cada uno se incluyó un grupo control de células tratadas con el solvente. Para cada extracto se calculó el porcentaje relativo de supervivencia con respecto al grupo control, y posteriormente, se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀, concentración del extracto que inhibe el crecimiento del 50 % de la población celular), para aquellos extractos que mostraron promisorio actividad biológica (CI₅₀<100 µg/mL). Posteriormente los extractos se clasificaron según criterios del National Cancer Institute (NCI), el cual, cataloga las sustancias experimentales como Activas (++) : CI₅₀<20 µg/mL, Moderadamente activas (+) : 20<CI₅₀<100 µg/mL e Inactivas (-) : CI₅₀>100 µg/mL¹⁰[28].

Ensayo de clonogenicidad: al tener en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad citotóxica, se evaluó el efecto de los extractos sobre la capacidad de división y formación de colonias sobre la línea celular más sensible a un mayor número de extractos. Las células se sembraron en placas de seis pozos (500 células/ pozo), lo que permitió su adhesión por un periodo de cuatro horas. Luego de ese tiempo, se trataron con los extractos activos en estudio (CI₅₀) por un periodo de 48 horas, luego del cual se retiró el agente citotóxico y se incubaron nuevamente por un periodo de 10 días para permitir la formación de colonias. Finalmente, las colonias se fijaron, teñidas con cristal violeta y contadas mediante el empleo de un estereomicroscopio (Leica EZ4, Wetzlar, Alemania). Se consideró como una colonia a un grupo conformado por mínimo 50 células. Cada ensayo se realizó por duplicado y en cada uno se incluyó un grupo control negativo de células tratadas con el solvente y un grupo control positivo tratado con doxorubicina^{11,12}[37,38].

Análisis estadístico: los resultados se expresaron como la media aritmética de los valores ± EEM (error estándar de la media), obtenidos de -al menos- dos ensayos independientes (n=4) y se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Dunnett para comparaciones múltiples, con valores de P<0.05, considerados como significativos. La CI₅₀ se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de concentración frente al porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

Resultados

Preparación de los extractos y tamizaje preliminar fitoquímico: en la **tabla 1** se presentan los rendimientos de los extractos totales etanólicos obtenidos a partir del material vegetal recolectado, donde se especifica, además, el solvente utilizado para su disolución con fines de utilización en los ensayos biológicos. En cuanto a la identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos, en la **tabla 2** se presentan los resultados de las pruebas de caracterización fitoquímica.

Tabla 2. Tamizaje preliminar fitoquímico de los extractos incluidos en el estudio.

Nombre científico	Alc	Cum	Tan	Gc	Fla	Sap	Tri/est	Qui
<i>M. charantia</i>	++	-	-	+	-	-	+	-
<i>P. peltatum</i>	+	-	++ +	+	++ +	+	++	+
<i>R. tuberosa</i>	-	-	+	-	+	++	++	+
<i>S. clausum</i>	-	-	-	++	++	-	-	+
<i>S. apetala</i>	++	++ +	+	-	+	-	-	-
<i>T. ochracea</i>	-	-	++	-	++	-	-	++ +
<i>T. cymosa</i>	++	-	-	++	++ +	++ +	+++	++
<i>T. peruviana</i>	-	-	-	++	++	-	-	+
<i>T. hirta</i>	++	+	-	+	++ +	++	++	-
<i>C. malambo</i>	+	-	+	-	++	-	++	-
<i>C. odoratissima</i>	++	++	-	-	-	-	++	-
<i>H. capitata</i>	+	++	++	+	-	+	+	-
<i>M. exotica</i>	++ +	++ +	-	-	+	++ +	+++	-
<i>D. inconstans</i>	+	+	++	-	-	++ +	++	-
<i>C. peltata</i>	++	-	++	+	++	++	+++	+

Convenciones: Alcaloides (Alc), Cumarinas (Cum), Taninos (Tan), Glicósidos cardiotónicos (Gc), Flavonoides (Fla), Saponinas (Sap), Triterpenos/esteroides (Tri/est) y Quinonas (Qui). (+++) Presencia abundante; (++) presencia moderada; (+) presencia leve; (-) Ausencia

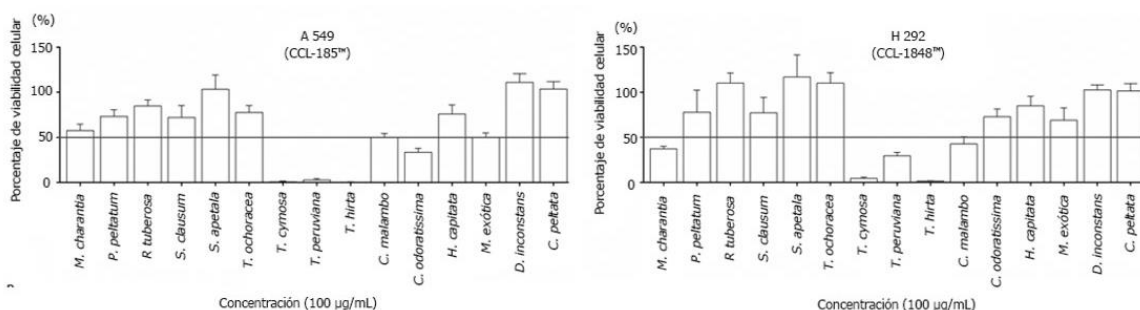


Figura 1. Efecto citotóxico de los extractos totales en estudio (100 µg/mL), frente a las líneas de carcinoma pulmonar: A) A 549 (CCL-185TM) y B) H292 (CCL-1848TM)

Actividad citotóxica: los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad biológica de los extractos vegetales se presentan en la **figura 1** y en la **tabla 3**, en donde se resalta la

actividad mostrada por seis de los extractos evaluados, los cuales exhibieron valores de CI_{50} inferiores a $100 \mu\text{g/mL}$, frente a alguna de las líneas en estudio.

Tabla 3. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los extractos activos frente a las líneas celulares epiteliales de cáncer pulmonar A549 y H292 y su clasificación según el NCI

Nombre científico	A549				H292			
	CI_{50}	LS	LI	Actividad	CI_{50}	LS	LI	Actividad
<i>M. charantia</i>	-	-	-	-	95,50	109,90	82,22	+
<i>T. cymosa</i>	34,04	37,58	30,83	+	49,88	60,26	41,31	+
<i>T. peruviana</i>	4,76	5,07	4,49	++	51,64	62,52	42,07	+
<i>T. hirta</i>	6,82	7,64	6,08	++	17,91	20,89	15,45	++
<i>C. odoratissima</i>	66,99	72,44	61,52	+	-	-	-	-
<i>C. malambo</i>	-	-	-	-	96,16	102,33	89,99	+

LS. Límite superior; Límite inferior. (++) Activos $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$; (+) Moderadamente activos $20 < CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$; (-) Inactivos $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

La línea celular A549 mostró ser sensible frente a los extractos de *T. cymosa*, *T. peruviana*, *T. hirta* y *C. odoratissima*, mientras que la línea celular H292 mostró ser sensible frente a un mayor número de extractos vegetales: *M. charantia*, *T. cymosa*, *T. peruviana*, *T. hirta* y *C. malambo*. Se tuvieron en cuenta los valores de CI_{50} , para clasificar los extractos según los criterios del NCI. Los extractos de *T. hirta* y *T. peruviana* quedaron catalogados como activos frente a la línea A549 y el extracto de *T. hirta* fue el único activo frente a la línea H292. En cuanto a los moderadamente activos, se encuentran los extractos de *T. cymosa* y *C. odoratissima* frente a A549 y *M. charantia*, *T. cymosa*, *T. peruviana* y *C. malambo*, frente a H292.

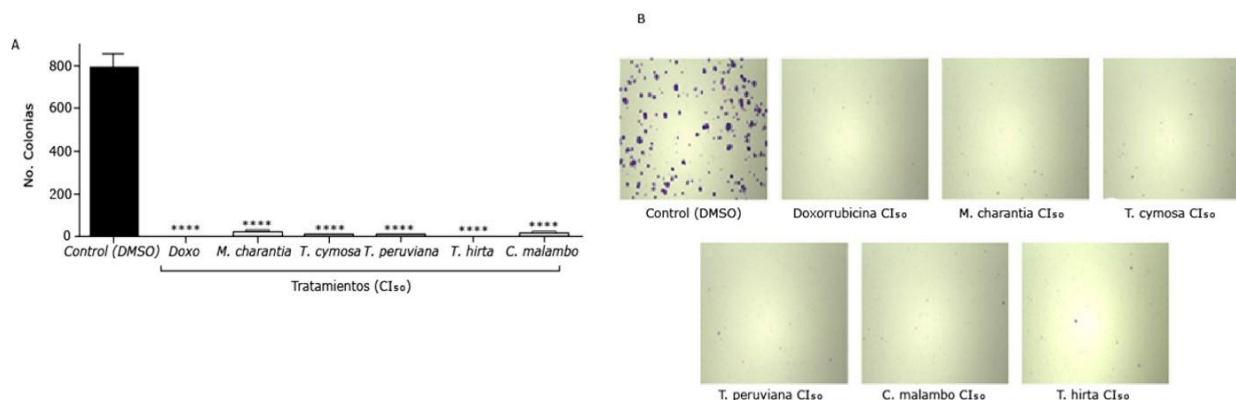


Figura 2. Efecto de los extractos activos sobre la formación de colonias en células H292. A) Número de colonias producidas luego de la incubación de las células (500/pozo). B) Imágenes representativas de las colonias generadas, las fotografías fueron tomadas con un aumento de 8X usando un estereomicroscopio (Leica EZ4)

Ensayo de clonogenicidad: la línea epitelial de carcinoma pulmonar H292 fue la más sensible al tratamiento con los extractos, por lo que fue seleccionada para evaluar el efecto de los extractos sobre la formación de colonias. Los resultados obtenidos de esta evaluación se presentan en la **figura 2**, donde se observa que todos los extractos evaluados a la concentración inhibitoria (CI₅₀) evitaron completamente la formación de colonias, en comparación con el grupo control no tratado. Es importante resaltar que todos los extractos evaluados mostraron una actividad comparable a la mostrada por la doxorubicina, agente quimioterápico de amplio uso en el tratamiento del cáncer, el cual fue utilizado como control positivo en el ensayo.

Discusión

desde tiempos milenarios, las plantas han constituido una fuente de sustancias que mitigan y curan los signos y síntomas de las enfermedades que más aquejan al ser humano ¹³[59]. Su modo de empleo va desde el uso de preparaciones obtenidas de sus diferentes órganos hasta el consumo de compuestos y principios activos aislados a través de diferentes procesos. El potencial terapéutico de este importante recurso natural se empieza a explorar normalmente en zonas rurales, en donde el acceso a medicamentos es limitado, hecho que contrasta con la abundancia de especies vegetales que crecen en esas zonas. La utilidad de las plantas medicinales ha sido ampliamente demostrada y validada científicamente. De hecho, los fármacos quimioterápicos -vinblastina, vincristina y paclitaxel- utilizados para tratar leucemias, linfomas, cáncer de seno, testículo y pulmón, fueron aislados de las especies vegetales *Catharanthus roseus* G. Don. y *Taxus brevifolia* Nutt ^{5,14,15}[23,24,27]. En el presente estudio, se inició la búsqueda de metabolitos bioactivos en especies vegetales de la Costa Caribe Colombiana, zona que posee una gran variedad y cuenta con una tradición ancestral en cuanto al uso de especies vegetales para contrarrestar los signos y síntomas de todo tipo de enfermedades, donde se incluye el cáncer. Entre los principales hallazgos, se destacaron las especies *T. hirta*, *T. peruviana* y *T. cymosa*, por su actividad frente a las dos líneas de cáncer de pulmón. El extracto de las hojas de *T. hirta* mostró potente actividad frente a estas líneas, con valores de CI₅₀<20 µg/mL. Estos resultados son similares a los informados por Hernández y otros, donde la fracción rica en polisacáridos -obtenida del extracto acuoso de las hojas de *T. hirta*- inhibió significativamente el crecimiento de líneas celulares de origen neoplásico, incluyendo células A549 (CI₅₀~60-120 µg/mL), sin afectar el crecimiento de fibroblastos humanos normales, lo cual es coherente con el uso medicinal dado a *T. hirta* por pacientes del Hospital Oncológico de Santiago de Cuba, para tratar diferentes tipos de cáncer, donde se incluyó el de pulmón ¹⁶[60]. En otro estudio realizado por el mismo autor, el extracto ya mencionado mostró inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama (T-47D) y de melanoma (SK-mel-3) ¹⁶[60], lo que en su conjunto demuestra la utilidad de *T. hirta* como reservorio de metabolitos con actividad citotóxica selectiva. De manera similar, *T. peruviana* mostró actividad en ambos tipos de células de cáncer de pulmón, con valores de CI₅₀<55 µg/mL. Esta especie vegetal cuenta con estudios de actividad antimicrobiana ¹⁷[61], antifúngica ¹⁸[62] y antiviral ¹⁹[63], así como de actividad citotóxica ^{20,21}[64,65]. Estos dos últimos estudios demostraron la utilidad del fruto y la semilla de esta especie para el tratamiento del cáncer, donde Ramos-Silva y otros expusieron que el extracto metanólico del fruto de esta especie induce apoptosis y fragmentación del DNA de células cancerígenas e inhibe selectivamente la proliferación de células de cáncer de mama (MCF7),

colon (HT-29), próstata (DU 145) y pulmón (NCI-H460), sin afectar el crecimiento de fibroblastos normales humanos (Detroit 548) y células epiteliales de riñón de mono (Vero). Por otra parte, Cheng y otros realizaron un estudio fitoquímico de las semillas de *T. peruviana* que condujo al aislamiento de siete glicósidos cardiotónicos con potente actividad frente a células de cáncer de pulmón (P15), páncreas (SW1990) y gástrico (MGC-803), al promover la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular en la fase G2/M. De manera similar a lo reportado por Cheng y otros, Beltrán Villanueva y otros ²²[30] evidenciaron la presencia de glicósidos cardiotónicos en las flores de esta especie, lo cual es coherente con los actuales resultados del estudio preliminar fitoquímico. Lo antes dicho muestra la presencia de glicósidos cardiotónicos en este mismo órgano y dichos compuestos -en función de los antecedentes- podrían estar relacionados con la importante actividad citotóxica mostrada por este extracto.

T. cymosa es una planta ampliamente utilizada en la medicina popular de países como Colombia, Venezuela y la Isla de Trinidad, por sus propiedades antivirales, antihelmínticas, anticancerígenas, analgésicas y larvicidas, con algunas de estas actividades demostradas científicamente. ^{23,24}[66,67] En lo que respecta al efecto anti-proliferativo, citotóxico o anticancerígeno, es posible considerar la presente comunicación científica como la primera de esta actividad, para esta especie en particular. En el aspecto fitoquímico, el género *Tabernaemontana* ha sido ampliamente estudiado, en específico para la especie *T. cymosa* y se ha reportado la presencia de alcaloides, compuestos cardiotónicos, flavonoides y derivados antracénicos²²[30], metabolitos reconocidos por su bioactividad, los cuales en su mayoría también fueron detectados en el actual estudio, conjuntamente con saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas.

Por otro lado, los extractos etanólicos de las hojas de *M. charantia* y la corteza de *C. malambo* mostraron solo efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la línea celular H292. La especie *M. charantia*, conocida popularmente como balsamina o melón amargo, es empleada en la medicina popular de muchos países por una amplia variedad de propiedades tales como abortivas, antihelmínticas, anticonceptivas, emenagogas, antimaláricas y antigotosas, así como para el tratamiento de la diabetes, cálculos renales, lepra, hemorroides, neumonía, psoriasis, reumatismo, fiebre y sarna ²⁵[68]. Extractos y fracciones obtenidas de su fruto han sido propuestos como alimentos funcionales para la prevención y el tratamiento del cáncer, probablemente por su alto contenido en saponinas. De hecho, la evidencia experimental preclínica demuestra que los extractos acuosos, etanólico y/o metanólico, así como compuestos aislados de esta especie poseen actividad anticancerígena, mediante inducción de apoptosis y alteración del ciclo celular, en un variado grupo de células tumorales, entre las que se incluyen células de adenocarcinoma pulmonar CL1-0 y A549. ^{26,27}[69,70] Entre los compuestos aislados de esta especie, charantagenina D, goyaglicosidos-d, charantagenina E, momordicosido K, estigmasta-7,25(27)-dien-3 β -ol y MGDG-C18:3-C18:3, han mostrado actividad citotóxica frente a células de cáncer de pulmón A549.

En tanto, *C. malambo* es utilizada tradicionalmente en forma de cataplasmas, baños, bebidas y emplastos para tratar diferentes trastornos en los que se incluyen afonía, amigdalitis, bronquitis, catarro, heridas, infección umbilical, desmayo, diabetes, diarrea, dolor corporal, dolor de cabeza junto al de encías, estómago, de muelas, de vientre, por golpes, herida umbilical, indigestión, infección dérmica, inflamación local, parto difícil, placenta retenida, resfriados y tos. Entre las partes más utilizadas de esta especie se encuentran la corteza, las

hojas y la planta entera. ²⁸[71] De la corteza, se han extraído aceites esenciales que se han caracterizado y se les han atribuido actividad biológica como antioxidante, citotóxico y acaricida ^{29,30} [72,73] mientras que, el extracto acuoso obtenido de este mismo órgano posee actividad anti-inflamatoria y anti-nociceptiva. Algunos compuestos extraídos como los diterpenos tetracíclicos (ent-16 β -17 α -dihidroxi-alurano), mostraron actividad citotóxica e inducción de apoptosis en células de carcinoma mamario (MCF-7). ^{31,32}[74,75]

Finalmente, *Capparis odoratissima*, es un arbusto ornamental, cuyas hojas son empleadas para tratar afecciones dermatológicas. ²²[30] La revisión bibliográfica realizada, muestra solo un reporte de actividad biológica frente al virus del dengue, ³³[76] de tal manera que los resultados expuestos representan uno de los primeros informes investigativos de la actividad biológica de esta planta y, el primero en comunicar el efecto citotóxico de esta especie vegetal.

En conclusión, se evidencia el potencial de las especies vegetales de la Costa Caribe Colombiana, como fuente para la obtención de metabolitos secundarios activos, entre las que se resaltan *T. cymosa*, *T. hirta* y *T. peruviana*, las cuales podrían contribuir al incremento del arsenal terapéutico disponible para el tratamiento del cáncer de pulmón, enfermedad que cada día cobra más vidas en Colombia y a nivel global. Se sugiere que la actividad anti-proliferativa evidenciada en extractos obtenidos de las especies *T. cymosa* y *C. odoratissima*, continúen siendo exploradas, a fin aislar e identificar los compuestos activos y elucidar los posibles mecanismos de acción involucrados.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Libis López y Kevin Bolaño, por su apoyo técnico en la realización de los experimentos. También agradecen a las fuentes de apoyo financiero: Universidad de Cartagena y Colciencias (Proyecto 591-2013 y Convocatoria 647-2014).

Conflicto de interés: Los autores declaran que no presentan conflicto de interés.

Contribuciones de los autores: L. Franco, R. Salas y F. Díaz concibieron y diseñaron el estudio. F. Díaz obtuvo los extractos totales de las especies en estudio, mientras D. Caro y L. Ospina realizaron los ensayos de evaluación biológica. D. Caro y Ocampo redactaron el primer borrador del artículo. R. Salas, F. Díaz y L. Franco revisaron el documento final.

CAPITULO 3. *Physalis angulata*, ALTERNATIVA NOVEDOSA POTENCIALMENTE ÚTIL PARA TRATAR EL CÁNCER COLORRECTAL

En esta etapa de la tesis doctoral se evaluó el potencial terapéutico de la especie vegetal *Physalis angulata* frente al cáncer colorrectal (CCR) asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La actividad biológica del extracto total (F0) y sus fracciones primarias mayoritarias (F0-1, F0-2, F0-3) fue evaluada bajo un esquema bio guiado (ensayo colorimétrico de MTT) utilizando dos (2) líneas de cáncer colorrectal (HT-29, ATCC® HTB-38™, Caco-2, ATCC® HTB-37™) y una línea celular epitelial colónica normal (CCD 841 CoN, ATCC® CLR-1790™). La fracción F0-2 (denominada de ahora en adelante PADF) demostró una elevada actividad frente a células de CCR (HT-29; $CI_{50}=13.82\pm 0.42$ $\mu\text{g/mL}$ y Caco-2; $CI_{50}=29.52\pm 3.73$ $\mu\text{g/mL}$), por tanto, fue escogida para profundizar en su estudio tanto fitoquímico como farmacológico.

La caracterización fitoquímica de PADF reveló la presencia abundante de ésteres de sacarosa, glicósidos, terpenos y esteroides, así como bajo contenido de whitanolidos, polifenoles totales y flavonoides. Esta cuantificación fue útil para realizar un control de calidad de obtención de PADF, ya que la cuantificación de estos metabolitos específicos nos permitió corroborar que la fracción obtenida conservaba los mismos componentes y en proporción similar a la fracción PADF previamente caracterizada en estudios anteriores. La evaluación farmacológica de PADF demostró que los compuestos presentes en esta fracción inhiben el crecimiento de células de cáncer colorrectal, especialmente el de las HT-29, hecho que se evidenció en los distintos modelos experimentales: cultivo 3D, formación de colonias (clonogenic) y migración celular (wound healing). Este efecto se encuentra relacionado con cambios en el ciclo celular (aumento de la proporción de células en fase G2/M) e inducción de apoptosis (Anexina A5 positivas), eventos que pueden asociarse a la fragmentación del DNA causando daño irreversible en las células de CCR. Este efecto sobre células HT-29 también puede relacionarse con la actividad anti-inflamatoria de PADF (medios condicionados), lo que nos llevó a probar el efecto *in vivo* de la fracción en un modelo de CCR asociado a EII (AOM/DSS).

En los ensayos *in vivo*, la administración de PADF no produjo efectos tóxicos, letales, genotóxicos (ensayo cometa neutro y prueba de micronúcleos) o mutagénicos (test de Ames) a las dosis evaluadas, por lo tanto, la fracción se considera segura a las dosis terapéuticas establecidas (10 y 20 mg/Kg, i.p.). Adicionalmente, se determinó como dosis letal 50 (LD₅₀, por sus siglas en inglés) un valor igual a 200 mg/kg de peso, siguiendo el protocolo establecido por la OECD [77]. El efecto de PADF, a nivel intestinal, fue evaluado en el modelo de CCR inducido por azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS), los resultados demuestran que la administración de PADF mejoró la carcinogénesis inducida a través de la reducción de la carga tumoral total, el número de tumores de gran tamaño (>1 mm) y la severidad de la enfermedad, aumentando el tamaño del colon lo que se tradujo en un aumento del W/L ratio (relación peso/longitud del colon). Sumado a lo anterior, PADF produjo una recuperación de la arquitectura del tejido colónico afectado, por reducción del crecimiento tumoral y la displasia, lo que puede relacionarse con la reducción de los niveles

de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) en las biopsias de colon de animales con AOM/DSS tratados con PADF. Al efecto antes mencionado se suma la reducción de la proteína PCNA (incrementada en procesos de inflamación y cáncer), aumento de la expresión de p38 (inductora de apoptosis) y MAPKs. Los resultados de este proyecto fueron presentados en varios eventos científicos y se encuentran consignados en el siguiente artículo científico.

1. *Active fraction of ground cherry (Physalis angulata L.) calyces attenuates azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced colon carcinogenesis in mice - Fracción activa de los cálices del tomatillo (Physalis angulata L.) disminuye la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano (AOM)/dextran sulfato de sodio (DSS) en ratones*

Yanet Ocampo^{1#}, Daneiva Caro^{1#}, David Rivera¹, Jenny Castro¹, Luis A. Franco^{1*}.

#Ambos se consideran primeros autores

**Autor de correspondencia*

En escogencia de revista para publicación.

Resumen

Physalis angulata L. (Solanaceae) se usa ampliamente en áreas tropicales y subtropicales del mundo para tratar diversos trastornos de salud. Como todos los miembros del género *Physalis*, sus frutos están envueltos por un cáliz, órgano particular que se considera una fuente continua de compuestos bioactivos. En Colombia, los cálices de esta especie son utilizados en la medicina tradicional como anti-cancerígeno y anti-inflamatorio, pero pocos soportes científicos respaldan estos usos. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, mostraron que la fracción en diclorometano obtenida del extracto total de los cálices de *P. angulata* (PADF) tiene actividad antibacteriana y anti-inflamatoria significativa. En el presente trabajo determinamos el efecto farmacológico de PADF sobre el cáncer colorrectal (CCR) utilizando células humanas y el modelo murino de cáncer inducido por azoximetano (AOM) / dextrán sulfato de sodio (DSS). Los resultados muestran que PADF produce selectivamente un efecto citotóxico sobre células tumorales mediante inducción de apoptosis y detención del ciclo celular en fase G2/M. En el modelo AOM/DSS, el tratamiento con PADF disminuyó los tumores, tanto en número como en tamaño, lo que se reflejó en la disminución del área afectada, con la consecuente reparación del tejido colónico. Estos efectos podrían estar relacionados con el aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica p38, la disminución de la expresión de PCNA; sin olvidar el efecto anti-inflamatorio de PADF que condujo a la disminución de los niveles de importantes mediadores pro-inflamatorios (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) que contribuyen a la recuperación del tejido colónico afectado. Nuestros resultados muestran el potencial de PADF como alternativa para el tratamiento del CCR y justifican su estudio continuo con el fin de investigar a profundidad los componentes bioactivos presentes en PADF.

Palabras clave: *Physalis angulata* L., Solanaceae, Cálices, Citotóxico, AOM/DSS, cáncer colorrectal.

Abreviaciones: AOM, azoximetano; CAC, cáncer asociado a colitis; CCR, cáncer colorrectal; DSS, dextrán sulfato de sodio; EII, enfermedad inflamatoria intestinal; IL, interleuquina; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; LPS, Lipopolisacárido; MAPKs, proteínas-quinásas activadas por mitógeno; NO, óxido nítrico; OD₅₅₀, densidad óptica a 550 nm; PADF, fracción en diclorometano de *Physalis angulata*; PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación; PGE 2, prostaglandina E 2.

Abstract

Physalis angulata L. (Solanaceae) is widely used in tropical and subtropical areas of the world to treat health disorders. As a member of the *Physalis* genus, its fruits are enveloped by an inflated calyx, a particular organ that is considered a prolific source of bioactive compounds. In Colombia, anti-cancer and anti-inflammatory activity are the most popular ethnopharmacological applications of *P. angulata* calyces but few studies on these effects are available. Previously, we report that its active fraction (PADF) showed significant anti-inflammatory activity. This research was focused on studying the pharmacological effect of PADF on colorectal cancer (CRC) using human cells and the azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulphate (DSS) murine model. PADF selectively induced a cytotoxic effect against CRC cells through apoptosis and G2/M arrest. In the AOM/DSS model, treatment with PADF diminished the tumors in number and size, the affected area and prompted colon tissue repair. These effects might be related to the increased expression of p38 pro-apoptotic protein, the reduction of expression of PCNA; in addition to the anti-inflammatory activity of PADF demonstrated by decreasing the levels of pro-inflammatory mediators (TNF- α , IL-6, and IL-1 β). Taken together, our results indicate the potential of PADF as an alternative treatment for CRC. Further investigation is warranted to identify the bioactive components present in PADF.

Keywords: *Physalis angulata* L., Solanaceae, Calyces, Cytotoxic, AOM/DSS, Colorectal cancer.

Abbreviations: AOM, Azoxymethane; CAC, colitis-associated cancer; CRC, Colorectal cancer; DSS, Dextran sulfate sodium; IL, IBD, inflammatory bowel disease; Interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, Lipopolysaccharide; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; NO, nitric oxide; OD550, optical density at 550 nm; PADF, *Physalis angulata* dichloromethane fraction; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PGE 2, prostaglandin E 2.

Introducción

El género *Physalis* (Solanaceae) está constituido aproximadamente por 71 especies distribuidas en las regiones templadas de América y Asia [78,79]. Las plantas pertenecientes a este género se reconocen por la presencia de cálices, llamativas estructuras que recubren el fruto protegiéndolo de daños externos (agresiones de aves o insectos y condiciones climáticas adversas) [78]. Los frutos son comestibles y las propiedades beneficiosas de las infusiones preparadas con diferentes órganos de la planta confieren a esta especie un gran valor dentro de la medicina tradicional a nivel mundial, siendo empleada para tratar inflamaciones, hepatitis, dermatitis, cáncer, diabetes, entre otros trastornos de salud [78]. Su actividad biológica ha sido asociada con la presencia de withanolidos (physalins, neophysalins, withaphysalins), diterpenos labdánicos, esteres de sacarosa, flavonoides, ceramidas, entre otros [78,80,81]. Entre las especies de este género, el tomatillo (*Physalis angulata* L.) es frecuentemente reconocida en la medicina popular colombiana, así como en la de países asiáticos y africanos, por sus propiedades antimicrobianas, anti-maláricas, anti-inflamatorias, anti-nociceptivas, anti-proliferativas e inmunomoduladoras [80,82,83]. Uno de los usos

populares más reconocido es como tratamiento de varios tipos de cáncer incluyendo el de cuello uterino, piel, pulmón, hígado, estómago y colorrectal [80]. Sin embargo, las propiedades biológicas de los cálices de *P. angulata* han sido poco estudiadas a pesar de su alto contenido de metabolitos secundarios útiles para la protección del fruto. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación enfocados en el fraccionamiento del extracto etanólico total obtenido de este órgano permitió la identificación de PADF, una fracción obtenida con diclorometano que mantuvo y mejoró la actividad mostrada por el extracto, particularmente al evaluar su efecto anti-inflamatorio [83–85]. En este sentido, PADF demostró un perfil anti-inflamatorio prometedor en diferentes modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* (macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, edema auricular inducido por TPA y colitis inducida por DSS) [83,84]. Continuando con el estudio de las propiedades farmacológicas de los cálices de *P. angulata*, en este trabajo se evaluó el efecto de PADF sobre el cáncer colorrectal (CCR) usando líneas celulares y el modelo murino de cáncer asociado a colitis (CAC) inducido por AOM/DSS. El CCR es un grave problema de salud pública que en 2020 causó más de 1.9 millones de nuevos casos y 915.880 muertes, siendo el tercer cáncer más común diagnosticado y la segunda causa de muerte por cáncer [5]. Después de las enfermedades hereditarias, la inflamación crónica se considera uno de los mayores factores de riesgo identificados en el desarrollo de CCR. De hecho, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye a la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, están claramente asociadas con la aparición y promoción del CCR debido a la inflamación crónica que favorece el crecimiento y desarrollo del tumor [86]. Independientemente de la causa, la terapia contra el CCR se enfrenta a serios desafíos como la resistencia de células cancerosas, reacciones tóxicas y los efectos secundarios de los fármacos que se emplean [14,18]. Por consiguiente, el reto es encontrar nuevas alternativas, particularmente en la medicina tradicional la cual ofrece una plétora de metabolitos bioactivos para el desarrollo de nuevas terapias, especialmente utilizando aquellas plantas medicinales que posean reportes científicos previos de la actividad biológica [14].

Materiales y métodos

Reactivos: AOM, cristal violeta, Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM), hematoxylin-eosin (H&E), McCoy's 5A medium, protease inhibitor cocktail y phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) fue obtenido de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). DSS (MW 36–50 kDa; MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA) y FBS (Gibco, Sao Paulo, Brazil). Todos los solventes (etanol, metanol, diclorometano, hexano y DMSO) fueron grado reactivo o HPLC obtenidos de Fisher Scientific, USA.

Recolección del material vegetal y preparación de PADF: el material vegetal (cálices de *P. angulata*) fueron recolectados en Loma de Arena, Bolívar, Colombia (10°43'59"N; 75°15'58"W). Una muestra de la planta completa fue enviada al Herbario de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, en donde el doctor Felipe Cardona Naranjo corroboró y autenticó que el material recolectado correspondía al voucher previamente depositado (HUA213028) [83]. Los cálices limpios y secos se emplearon para preparar la fracción PADF siguiendo el procedimiento descrito previamente por [83], quien reportó, además del proceso de obtención, la cuantificación de metabolitos secundarios representativos (ésteres de

sacarosa, withanolidos compuestos fenólicos y flavonoides (ver **Supporting information**) y la caracterización de compuestos mayoritarios presentes en PADF por HPLC [Datos no mostrados].

Cultivos celulares: líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (HT-29 y Caco-2), células epiteliales colónicas sanas (CCD 841 CoN) y macrófagos murinos (RAW 264.7) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC® Manassas, VA, USA) y mantenidas a 37°C y 5% CO₂ en McCoy's 5A medium (HT-29) o EMEM (Caco-2 y CCD 841 CoN) suplementado con 10% FBS y 1.5 g/L bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Ensayo de viabilidad celular: HT-29 (HTB-38™), Caco-2 (HTB-37™) o CCD 847 CoN (CRL-1790™) fueron sembradas a densidad apropiada para cada línea (5.000-15.000 células/pozo) en placas de 96 pozos (2D-culture) o en placas Perfecta3D® Hanging Drop Plate (3D- culture; 3D Biomatrix, Ann Arbor, Michigan, USA) e incubadas por 24 h (2D) o 72 h (3D) para permitir la adhesión o la formación del esferoide. Posteriormente, las células fueron tratadas con PADF (3.13-25 µg/mL) o vehículo (metanol) por 48 h. La viabilidad celular fue medida usando una solución de MTT (0.25-5 mg/mL). Trascorridas 4 h, se disolvieron los cristales de formazán formados y la OD_{550nm} fue determinada usando un lector de placas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Ensayo de clonogenicidad: la capacidad replicativa de células HT-29 fue confirmada usando el método descrito previamente por [37,38]. 750 células/pozo fueron cultivadas en placas de 6 pozos por 6 h y posteriormente tratadas con PADF (0-27.64 µg/mL) o vehículo por 48 h. Después de este tiempo, el medio fue reemplazado por medio fresco y se dejaron formar las colonias por 7 días. Finalmente, las colonias se fijaron y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% para ser contadas usando un estereomicroscopio (EZ4 HD, Leica Microsystems, Singapore).

Ensayo de cicatrización (wound healing): células HT-29 (2x10⁵ células/pozo) se dejaron crecer en placas µDish^{35mm} (Ibidi, Munich, Germany) hasta confluencia absoluta. Posterior a esto, el inserto central fue removido para generar separación homogénea en forma linear en la monocapa y se trataron con PADF (6.91 y 13.82 µg/mL) o vehículo. El cultivo fue monitoreado usando un microscopio invertido (Nikon, Melville, NY, USA) equipado con una cámara digital por un periodo de 24 h a 72 h recolectando tres imágenes por réplica en cada punto de tiempo. El área de separación entre las monocapas fue medida usando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) y los valores fueron normalizados con respecto a la medida del área abierta a tiempo 0 h.

Ensayo de viabilidad celular usando medios condicionados: macrófagos RAW 264.7 (TIB-71™) mantenidos en DMEM suplementado con 10% de FBS a 37°C y 5% CO₂, fueron cultivados en placas de 24 pozos (200.000 células/pozo). Después de 48 h, los macrófagos fueron tratados con una concentración no tóxica de PADF (12.5 µg/mL/1h) y luego se estimularon con LPS (1 µg/mL) o IL-4 (40 ng/mL) por 6 h para inducir un perfil inflamatorio M1(LPS) o alternativo M2(IL-4). Los sobrenadantes del cultivo fueron recolectados y adicionados a células HT-29 previamente sembradas en placas de 96 pozos que posteriormente fueron incubadas por 48 h. En todos los experimentos se incluyó un grupo de macrófagos solo estimulados con LPS o IL-4. La viabilidad de las células HT-29 se

determinó usando el método de MTT descrito previamente en la sección *Ensayo de viabilidad celular*.

Análisis del ciclo celular y apoptosis: se empleó citometría de flujo para analizar el efecto sobre la distribución de las fases del ciclo celular de HT-29 usando tinción con yoduro de propidio (propidium iodide-PI / kit ab139418; Abcam, Cambridge, UK) y para la detección de células apoptóticas se utilizó la tinción con Annexin V-FITC (BMS500FI-100; eBioscience™, San Diego, CA). En breve, 2×10^5 células/mL fueron expuestas a PADF (3.3-27.6 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h. Para el análisis del ciclo celular, una vez recolectadas, las células se fijaron con etanol frío al 66% y teñidas con PI e incubadas con RNase A. Para la apoptosis, las células se recolectaron y teñieron con Annexin V-FITC y PI. En ambos casos, el análisis se realizó empleando un citómetro de flujo (FACS Aria III, BD Biosciences, San José, CA).

Evaluación del cambio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$): el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) fue monitoreado usando el kit JC-1 Mitochondrial Membrane Potential (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Células HT-29 (1×10^4 células/pozo) fueron sembradas y expuestas a PADF (0-27.64 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h. Posteriormente, las células se incubaron con JC-1 staining solution por 15 min y se enjuagaron con el buffer siguiendo las indicaciones del fabricante. Las mediciones de la fluorescencia se realizaron usando un fluorómetro de microplacas (Infinite 200 PRO, Tecan Trading AG, Switzerland) para cuantificar la fluorescencia de los J-aggregates (excitación 535 nm y emisión 595 nm) y los J-monomers (excitación 485 nm y emisión 585 nm).

Animales de experimentación: ratones Balb/c hembras ($19.41 \pm 0.13\text{g}$) fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia). Los animales se hospedaron en cajas de policarbonato provistas de tapa con filtro y mantenidos en un ambiente controlado ($19.48 \pm 0.10^\circ\text{C}$, $68.63 \pm 1.15\%$ de humedad relativa y ciclos de luz/oscuridad de 12 h) con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos se diseñaron y ejecutaron siguiendo las guías y regulaciones locales e internacionales (European Union regulations (CEC council 86/809), EU Directive 2010/63/EU, protocols of the Organization for Economic Co-operation and Development, OECD). Adicionalmente, todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Cartagena (Acta de aprobación del proyecto No. 81 de Agosto 13 de 2015).

Modelo de CCR inducido por AOM/DSS: ratones Balb/c ($n=12-32$) entre las 5 y 6 semanas de edad fueron aleatoriamente ubicados en alguno de los siguientes grupos: control (vehículo), CAC-control (AOM/DSS) y tratados (PADF 10 y 20 mg/Kg, IP). Se indujo carcinogénesis por inyección única de AOM (10 mg/Kg, i.p.). Una semana después, los animales, a excepción del grupo control (vehículo), recibieron DSS (2-4%) en el agua por 7 días. Para promover una inflamación crónica que conduzca al desarrollo de tumores, los animales se expusieron a tres ciclos de DSS de 7 días cada uno, interrumpidos por 14 días de agua regular (**Fig. 4a**) [87]. A los grupos tratamiento se les administró PADF durante 21 días (10 y 20 mg/Kg, i.p.), dosis que fueron seleccionadas en estudios de toxicidad aguda previamente realizados (**Supporting information**). Para verificar la seguridad de las dosis escogidas, se incluyeron en el estudio dos grupos de animales que fueron administrados diariamente con PADF 10 y 20 mg/Kg/día, respectivamente, pero no recibieron AOM o DSS. Durante todo el experimento, el peso corporal y la consistencia de las heces fue monitoreada constantemente y, posterior al sacrificio se determinaron parámetros macroscópicos como la

longitud y peso del colon, relación peso/longitud (W/L), progresión del cáncer (numero, tamaño y carga tumoral). Una porción del colon fue enrollada desde el extremo proximal hasta el distal (“Swiss roll”) con el fin de realizar la evaluación histológica del tejido colónico completo. Además, se recolectaron muestras de tejido colónico que contenían tumores y tejido de control adyacente de apariencia normal para su posterior análisis.

Análisis histológico: los “Swiss rolls” se preservaron en formalina tamponada y se incluyeron en bloques de parafina para luego ser seccionados en láminas de 5 μm y teñidos con H&E. Los cortes de tejido fueron examinados por dos investigadores en un esquema ciego usando microscopía óptica (DM500, Leica Microsystems, Singapore). Para valorar el daño histológico, se evaluaron tres factores: gravedad de la inflamación de la mucosa, displasia y cáncer. El daño epitelial y la infiltración celular se calificaron con puntajes de 0 a 4 como se describe en [88]. La propagación de la displasia se calificó como displasia de bajo o alto grado y se puntuó considerando el área de la superficie mucosa afectada (0-3). El cáncer se calificó como ausente (0), invasivo temprano (1) o avanzado (2).

Análisis de la expresión de proteínas: el tejido colónico fue homogenizado usando TPER® extraction reagent suplementado con protease inhibitor cocktail y PMFS (Western blot) o cOmplete tablets Mini, EDTA free (Roche, Mannheim, Germany) (ELISA). Las proteínas extraídas fueron cuantificadas usando el método de Bradford usando Quick Start Bradford™ 1x Dye reagent (Bio-Rad, USA) y Quick Start™ Bovine Serum Albumin (BSA) Standard (Bio-Rad, USA). Se midieron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en sobrenadantes usando mouse ELISA kits (Invitrogen, San Diego, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se empleó Western blot para evaluar la expresión de β -catenin, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, p-p38/p38 y PCNA tal y como se detalla en **Supporting information**.

Análisis estadístico: todos los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) fue calculada usando regresión no lineal. Los grupos fueron comparados estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de Dunnett’s para comparaciones múltiples. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados y discusión

Este trabajo presenta evidencia del potencial terapéutico de los cálices del tomatillo (*P. angulata*) en el contexto del CAC. Aunque este no es el primer estudio en el que se reconoce e identifica el promisorio efecto antitumoral de derivados obtenidos de los cálices de especies del género *Physalis* [89], nuestro trabajo ofrece un compendio de resultados obtenidos a través del desarrollo de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, que muestran la efectividad de PADF, así como algunos mecanismos de acción asociados a el efecto biológico observado.

Se obtuvieron 3.15 g de la fracción en diclorometano (PADF) a partir de 114 g de cálices secos de *P. angulata* (rendimiento del proceso: 2.76%) recolectados en la Costa Caribe Colombiana. Tomando como base la información previamente reportada por [83], se cuantifico el contenido de cuatro tipos de metabolitos (withanolidos, ésteres de sacarosa, compuestos fenólicos y flavonoides), detectándose en cantidades significativas a los ésteres de sacarosa como componente mayoritario de PADF (**Tab. S1, Supporting information**). El alto contenido de glicósidos (ésteres de sacarosa) contrasta con el bajo contenido de

withanolidos, compuestos fenólicos y flavonoides, siendo estos últimos prácticamente indetectables. PADF es una fracción enriquecida en ésteres de sacarosa, metabolitos presentes en otras especies del género *Physalis*, reconocidos por sus propiedades anti-inflamatorias [81,90,91]. A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta el importante efecto anti-tumoral de una fracción enriquecida en ésteres de sacarosa obtenida de los cálices de *P. angulata*.

La **Fig. 1a** muestra el efecto inhibitorio de PADF sobre el crecimiento de líneas celulares originadas a partir de adenocarcinoma colorrectal. Las células HT-29 y Caco-2 fueron notablemente sensibles a PADF, mostrando valores de CI_{50} de $13.82 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$ y $29.56 \pm 3.73 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En contraste, las células epiteliales normales de colon, CCD 841 CoN, no fueron afectadas significativamente por PADF a concentraciones citotóxicas (por ejemplo, $12.5 \mu\text{g/mL}$) mostrando una CI_{50} de $44.80 \pm 1.77 \mu\text{g/mL}$ e índice de selectividad de 3.24 (HT-29) y 1.52 (Caco-2). Asimismo, PADF demostró baja citotoxicidad sobre otros tipos celulares no cancerosos como MRC-5 ($CI_{50} = 15.47 \pm 1.21 \mu\text{g/mL}$) [Gráfico no mostrado] y PCS-201-012 ($CI_{50} = 30.71 \pm 1.92 \mu\text{g/mL}$) [85], proporcionando confirmación adicional del efecto inhibitorio selectivo de PADF sobre las líneas celulares de CCR.

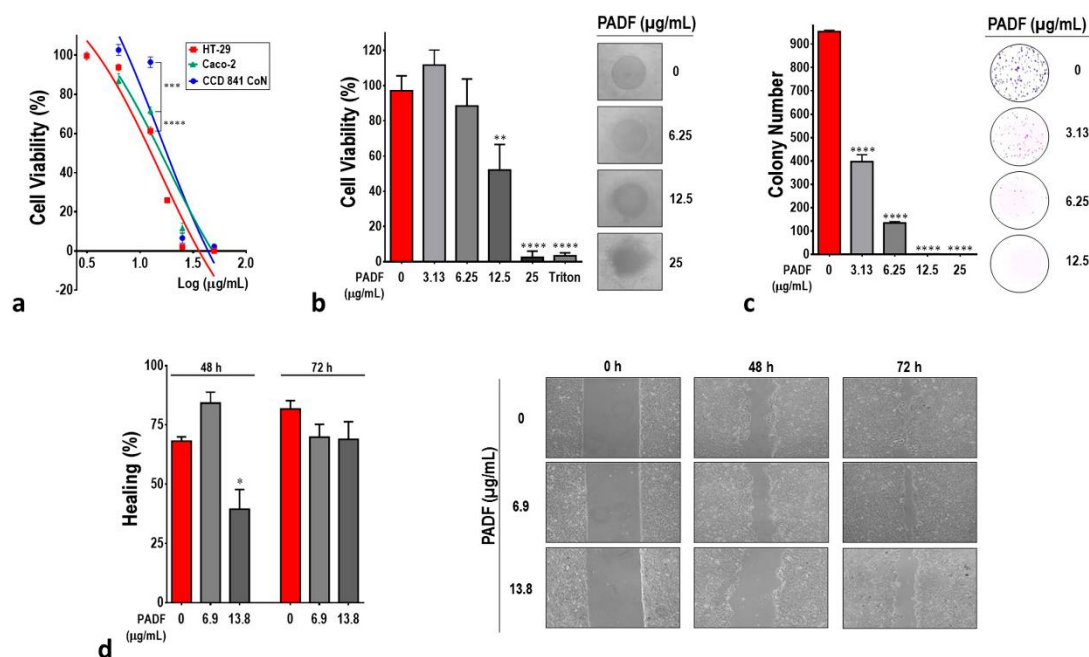


Figura 1. Fracción de *P. angulata* (PADF) afecta la proliferación y la migración de las células de cáncer colorrectal (CRC). **(a)** Efecto de PADF sobre la viabilidad de células epiteliales colónicas malignas y normales usando el ensayo de MTT. **(b)** Actividad citotóxica de PADF frente a esferoides formados con células HT-29 (3D culture). **(c)** Efecto de PADF sobre la formación de colonias de células HT-29 – Ensayo de clonogenicidad. **(d)** Efecto de PADF sobre la migración celular de HT-29 – Ensayo de Wound healing. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n=12) y son representativos de al menos tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ y (****) $P < 0.0001$ vs. grupo control (sin tratamiento).

Dado que las células HT-29 mostraron mayor susceptibilidad, se seleccionó esta línea celular para estudiar a fondo el efecto biológico de PADF. Inicialmente, su efecto citotóxico fue probado a diferentes tiempos de exposición, lo que permitió demostrar que PADF ejerce efectos citotóxicos significativos en un tiempo mínimo de 6 h, actividad que se mantiene y aumenta para alcanzar el máximo efecto a las 48 h (**Fig. S1a, Supporting information**). Aprovechando la capacidad de crecimiento como esferoides que poseen las células HT-29 se realizó un cultivo tridimensional (3D) con estas células, a fin de obtener una reproducción más real del microambiente del cáncer, ya que este tipo de técnica refleja interacciones fisiológicas relevantes entre células [92]. Como se aprecia en la **Fig. 1b**, la actividad de PADF se conservó en este modelo experimental ($CI_{50}=13.31\pm 4.50 \mu\text{g/mL}$), mostrando que esta fracción posee además un efecto anti-tumoral [93]. Aunque los esferoides son de un solo tipo de células, son una aproximación simple en 3D útil para representar un CCR, por tanto, el resultado obtenido sugiere que PADF podría mostrar eficacia en entornos experimentales más complejos. En este mismo sentido, PADF inhibió de manera concentración-dependiente la capacidad de formación de colonias y la capacidad de restauración de la monocapa -wound healing- (**Fig. 1c y 1d**), lo que sugiere que PADF afecta no solo a la proliferación sino también a la migración de las células de CCR.

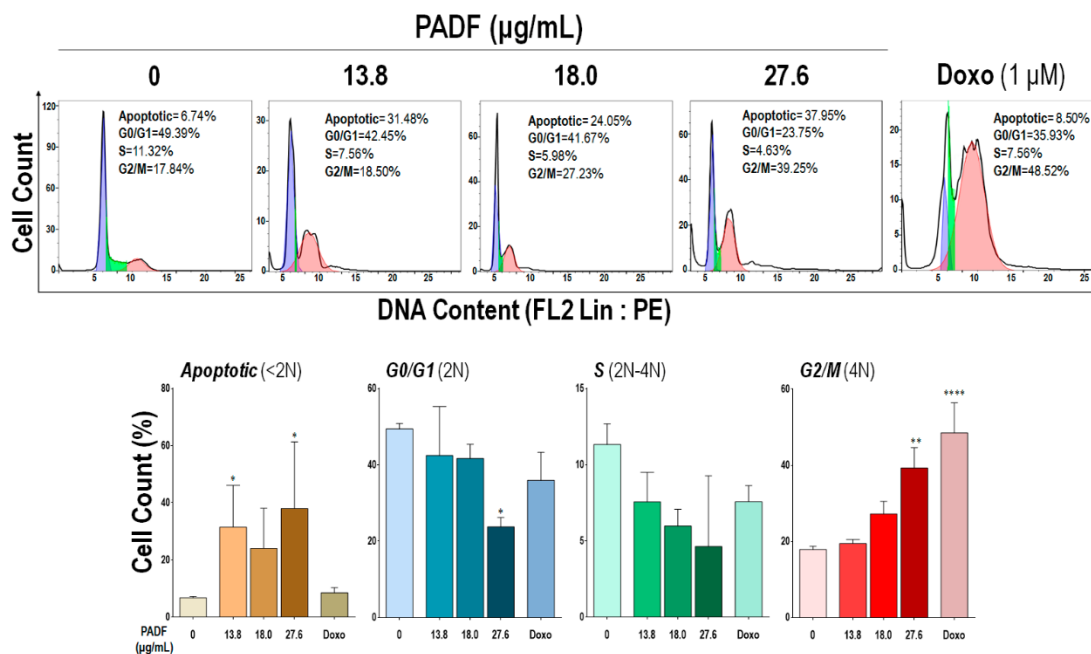


Figura 2. Análisis del ciclo celular de la línea HT-29 después de exponerlas a diferentes concentraciones de PADF por 48 h. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n=12) y son representativos de al menos tres experimentos independientes. (*) $P<0.05$, (**) $P<0.01$ y (****) $P<0.0001$ vs. Grupo control (sin tratamiento).

Con el fin de obtener mayor información relacionada con los mecanismos de acción de PADF, se empleó la citometría de flujo para detectar cambios en el ciclo celular de la línea HT-29 tratada. Como se evidencia en la **Fig. 2**, PADF induce arresto celular en la fase G2/M del ciclo y aumentó significativamente la proporción de células en sub-G1, lo que sugiere inducción de apoptosis. El arresto en el punto de control G2/M bloquea la entrada a la mitosis

cuando el DNA está dañado para permitir la activación de los mecanismos de reparación o la inducción de la muerte celular programada [94]. Para confirmar este importante efecto biológico, se detectó la presencia de tres signos característicos presentes en las células apoptóticas, tales como reducción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$, apoptosis temprana), translocación de la fosfatidilserina (marcado con Annexin-V, apoptosis temprana/media) y fragmentación del DNA (apoptosis tardía) [95]. Como puede verse en la **Fig. 3a**, la tinción con Annexin-V mostró que PADF produce un aumento significativo en la proporción de células con translocación de la fosfatidilserina (apoptóticas - tanto en fase temprana como tardía), especialmente a la concentración más alta probada. Consistentemente, este efecto fue acompañado por una reducción significativa de $\Delta\Psi_m$ (**Fig. 3b**), así como la degradación del DNA en las células HT-29 tratadas con PADF (**Fig. 3c**). Por tanto, todos los resultados obtenidos nos llevan a concluir que PADF afecta la proliferación de células de CCR al inducir en ellas todas las fases de la apoptosis, desde la temprana hasta la tardía. Para verificar si estos cambios estaban asociados a la generación de estrés oxidativo, se midió la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) tal como se describe en **Supporting information**. Sin embargo, no se detectaron cambios en la producción de estas especies, por tanto, la apoptosis inducida PADF no se da por esta vía específica (**Fig. 1Sb, Supporting information**).

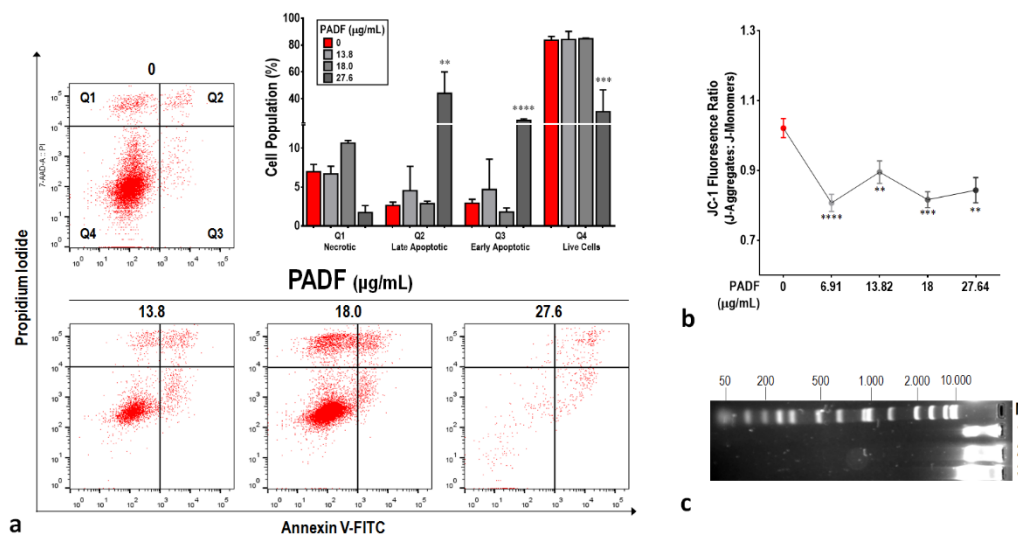


Figura 3. Evidencia de la inducción de apoptosis en células HT-29 por PADF. (a) Los histogramas muestran el número de células vs. el contenido de DNA marcado con yoduro de propidio (PI) y Annexin V-FITC; de poblaciones celulares en diferentes estados (Vivas-Live, Apoptóticas-Apoptotic y Necróticas-Necrotic). (b) Potenciales de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células no tratadas y tratadas con PADF (6.91-27.64 $\mu\text{g/mL}$). (c) Fragmentación del DNA producida por el tratamiento con PADF (1 – Control sin tratar, 2 – PADF 13.8 $\mu\text{g/mL}$ y 3 - PADF 27.6 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n=12-32) y son representativos de al menos tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ y (****) $P < 0.0001$ vs Grupo control (sin tratamiento).

Al notar los resultados prometedores obtenidos *in vitro* así como la fuerte actividad anti-inflamatoria observada previamente por [83], se decidió evaluar PADF en un modelo de CAC, una enfermedad resultante de la secuencia inflamación-displasia-carcinoma donde hay

proliferación de células malignas, aumento de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 y factor de necrosis tumoral-TNF- α), e hiperactivación de varias vías de señalización (proteínas quinasas activadas por mitógenos-MAPKs; el factor de transcripción nuclear NF- κ B y Wnt/ β -catenin) [95]. El uso de modelos animales ha permitido obtener la mayor parte del conocimiento relacionado con la investigación del cáncer, como identificación de carcinógenos, desarrollo de la patogénesis y su progresión, y ha contribuido enormemente a uno de los aspectos más importantes en este campo como es la identificación de candidatos a fármacos durante el desarrollo preclínico. A pesar de sus limitaciones, la combinación de AOM y DSS como modelo de CAC ha ganado popularidad por su reproducibilidad, potencia, bajo precio y facilidad de uso [96].

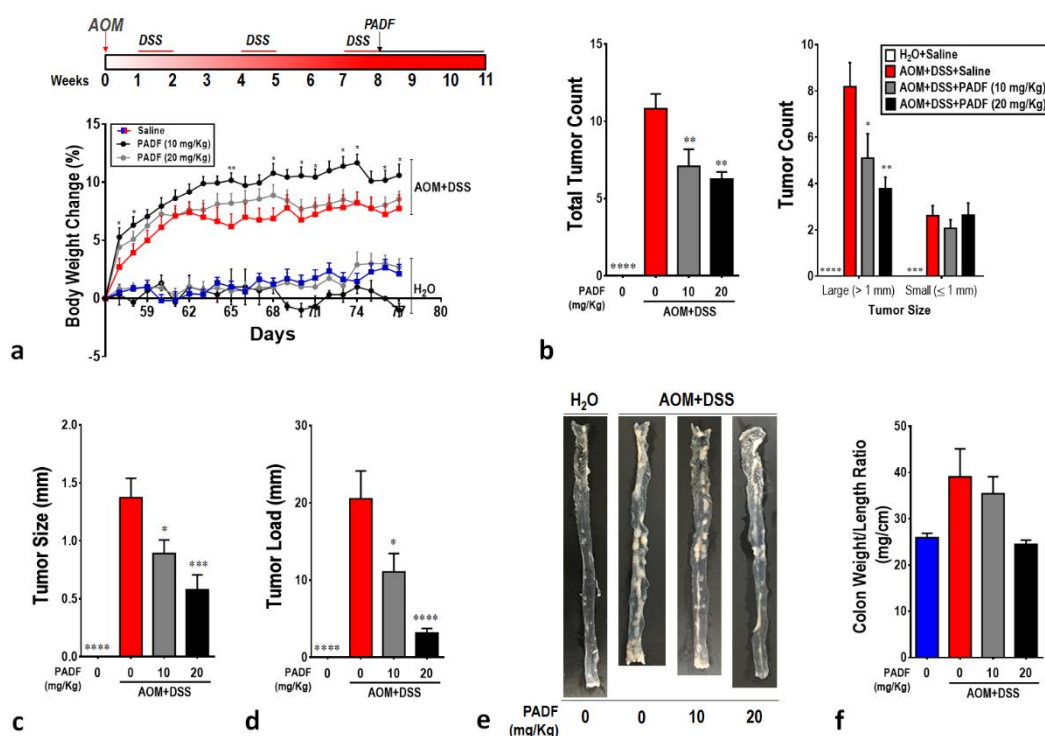


Figura 4. Efecto terapéutico de PADF en el modelo murino AOM/DSS – Parámetros macroscópicos. (a) Diseño experimental y cambios en el peso corporal de los animales durante el estudio. (b), (c), (d) Progresión tumoral (Número total de tumores, clasificación dependiendo del tamaño y carga tumoral). (e) Fotografías representativas de la evaluación macroscópica del tejido colónico. (f) Relación peso/longitud (W/L) del tejido colónico (mg/cm). Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n=12-32) y son representativos de al menos tres experimentos independientes. (*) P<0.05, (**) P<0.01, (***) P<0.001 y (****) P<0.0001 vs. CAC-control.

Como se esperaba, la administración de AOM/DSS produjo una disminución dramática del peso corporal de los animales, específicamente al final del último ciclo de DSS (Fig. 4a), efecto que fue reestablecido significativamente en los animales tratados con PADF a una dosis de 10 mg/Kg/día, mientras que los animales que recibieron la dosis más alta (20 mg/Kg/día) no lograron revertir este signo de la enfermedad. La evaluación macroscópica de las biopsias de tejido colónico extraídas *post-mortem* reveló que el 100% de los animales del

grupo CAC-control (AOM/DSS+saline) desarrollaron tumores en el colon medio y distal con un promedio de 10.82 ± 0.96 ; en contraste, el grupo control negativo no desarrolló tumores (**Fig. 4b**). PADF (10 y 20 mg/Kg/día) redujo marcadamente la carga tumoral total, disminuyendo específicamente el número de tumores de gran tamaño (>1 mm), también redujo significativamente el tamaño tumoral lo que se reflejó en la carga tumoral disminuida (35-85%) (**Fig. 4c-4e**). Para evaluar más a fondo la gravedad de la enfermedad, se midió la relación peso/longitud (W/L) del colon y; como se esperaba, este parámetro se redujo en animales tratados con PADF. El examen histológico de las secciones de colon teñidas con H&E del grupo de CAC-control confirmó la presencia de grandes adenomas o adenocarcinomas dentro del lumen y extensión prominente de la displasia (tanto en alto como en bajo grado), acompañada de inflamación leve del epitelio e infiltración celular. (**Fig. 5a-5b**). El tratamiento con PADF (10 y 20 mg/Kg) promovió la recuperación de la arquitectura tisular al reducir el crecimiento tumoral y la displasia, reduciendo así el puntaje (score) de la enfermedad (3.48 ± 0.35 vs. 2.21 ± 0.19) (**Fig. 5b**).

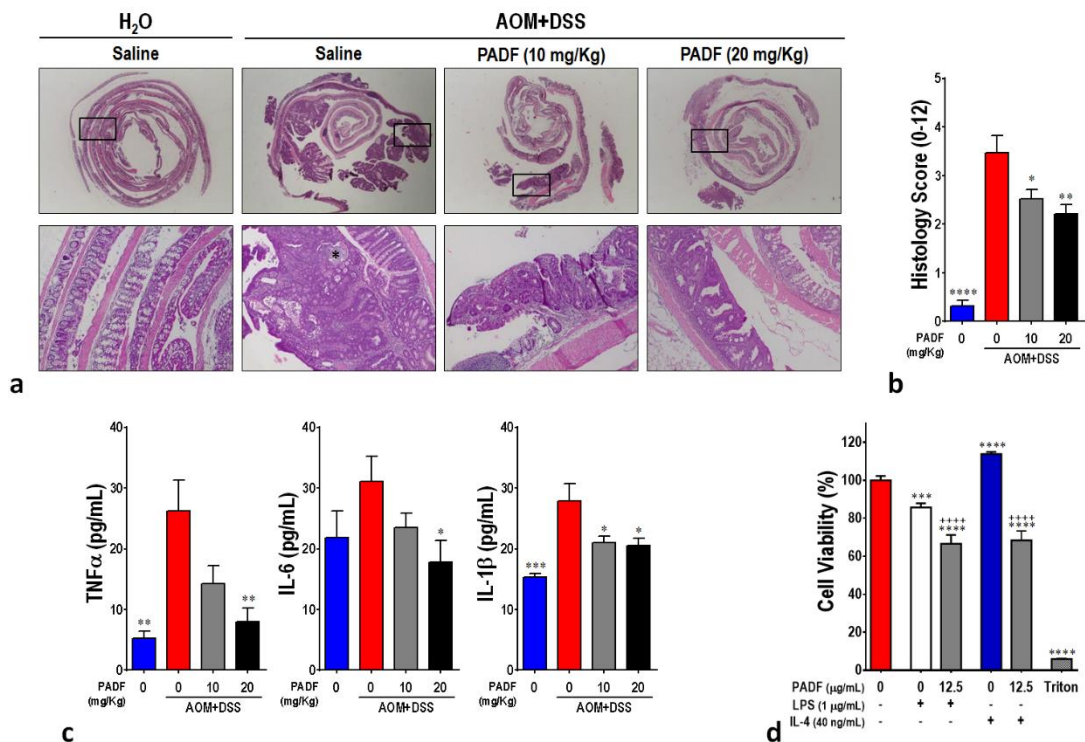


Figura 5. PADF mejora el daño macroscópico inducido por AOM/DSS en ratones. (a) Fotografías representativas del examen histopatológico (H&E staining, top panel: 8X, bottom panel: 10X, * crypt abscess). (b) Score de daño histológico calculado como se describe en la sección Materiales y métodos - Análisis histológico. (c) Nivel de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido colónico. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n=12-32) y son representativos de al menos tres experimentos independientes (*) P<0.05, (**) P<0.01, (***) P<0.001 y (****) P<0.0001 vs. CAC-control o vs. Grupo control (sin tratamiento). (++++) P<0.0001 vs. grupo LPS o IL-4 (sin tratamiento).

Durante todo el tiempo del estudio, el grupo control de toxicidad (sin AOM o DSS), administrado solamente con la máxima dosis de PADF, fue monitoreado y no presentó cambios en su peso corporal, estado de salud o algún signo o síntoma de toxicidad (**Tab. S3**,

Fig. S2, Supporting information). Además, un análisis detallado realizado *post-mortem* reveló que sus órganos y los parámetros hematológicos no estaban alterados y no presentaban diferencias al compararse con los del grupo control sano (vehículo) (**Tab. S2-S3, Supporting information**). En este mismo sentido, PADF tampoco induce efectos genotóxicos como muestran los resultados obtenidos al aplicar el test de Ames, el de micronúcleos y el de cometas (**Fig 2S, Supporting information**). En términos generales nuestros resultados proporcionan evidencia de la seguridad de PADF a la dosis máxima evaluada.

Como previamente se discutió, la liberación sostenida de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO y PGE 2) pueden acelerar el proceso de carcinogénesis en el colon tanto en humanos como en ratones; por lo tanto son dianas biológicas importantes que deben analizarse en un modelo de CAC [97–100]. Como se aprecia en la **Fig. 5c**, al medirse los niveles de estas citoquinas en biopsias de colon, los grupos tratados con PADF mostraron una reducción significativa de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en comparación con el grupo CAC-control. Este efecto anti-inflamatorio de la fracción de *P. angulata* promueve la recuperación del tejido colónico y la regeneración de la mucosa que, sumado al efecto citotóxico que ejerce sobre las líneas celulares de CCR, hace de PADF una alternativa interesante para tratar el CAC. Como el efecto inmunomodulador sobre macrófagos reportado previamente para PADF [83] podría generar cuestionamientos, evaluamos si la fracción podría inhibir la proliferación de células de HT-29 tratadas con sobrenadantes de macrófagos activados con diferentes agentes y tratados con PADF (medios condicionados). Las células HT-29 tratadas con medios condicionados obtenidos de macrófagos no tratados y activados con LPS o IL-4 mostraron baja y alta proliferación, respectivamente (**Fig. 5d**). Mientras que los medios obtenidos de macrófagos tratados con PADF (12.5 μ g/mL) y activados con LPS o IL-4 disminuyeron el crecimiento y la proliferación de células HT-29 independientemente del estímulo que recibieron los macrófagos para producir el medio condicionado.

Para extender nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de acción asociados al efecto biológico beneficioso de PADF, la expresión de PCNA, β -catenin y MAPKs (ERK, JNK, y p38) fue determinada como marcadores de proliferación anormal, inflamación y respuesta al estrés. El análisis Western blot de muestras del tejido colónico mostraron que PADF (10 y 20 mg/Kg/día) reduce significativamente la expresión de PCNA mientras que aumenta la fosforilación de las MAPKs en comparación con el grupo CAC-control (AOM/DSS+Saline) (**Fig. 6a-b**). Dado que PCNA está involucrada en la síntesis de DNA y en la iniciación de la proliferación celular [97,100], los resultados obtenidos sustentan aún más el efecto inhibitorio de PADF sobre células malignas en el CCR. El incremento de la fosforilación de las MAPKs por *P. angulata* parece contradictorio debido a que la activación de estas vías están relacionadas con la patogénesis y progresión del cáncer [99,101,102]. No obstante, la activación de esta vía es dinámica, pasando de estados de silenciamiento a hiperactivación durante la secuencia inflamación-displasia-carcinoma que tiene lugar en la generación de la enfermedad con el modelo AOM/DSS. Por ejemplo, p-p38 es una proteína quinasa altamente expresada durante la fase de inflamación, pero cuando el carcinoma y las condiciones para su progresión están establecidas, p-p38 regresa a sus niveles normales de expresión. PADF fue administrada a los animales durante la fase de alto grado de displasia-carcinoma, en donde se observó un incremento de p-p38 que puede relacionarse con la inducción de apoptosis de células malignas; similar al mecanismo de acción de fármacos utilizados en la

terapia contra el cáncer como cisplatino, doxorrubicina y camptotecina [103,104]. De hecho, estudios recientes concuerdan que p38 juega un papel crítico en la protección y mantenimiento de las células epiteliales, favoreciendo a la conservación de la función de barrera y homeostasis en el colon [105]. En el caso de ERK y JNK, se ha demostrado que varios compuestos de origen natural inducen apoptosis en células de cáncer por aumento de la fosforilación de JNK y ERK [104,106,107]. La inhibición de PCNA y la activación de p-p38 fue confirmada usando células de CCR humanas (**Fig. 6c-d**). En este último modelo experimental, se observó además, que la fracción activa de *P. angulata* disminuyó la expresión de β -catenin, indicando una inhibición de la vía de señalización Wnt, cuya activación contribuye a la iniciación y progresión del cáncer colorrectal [106].

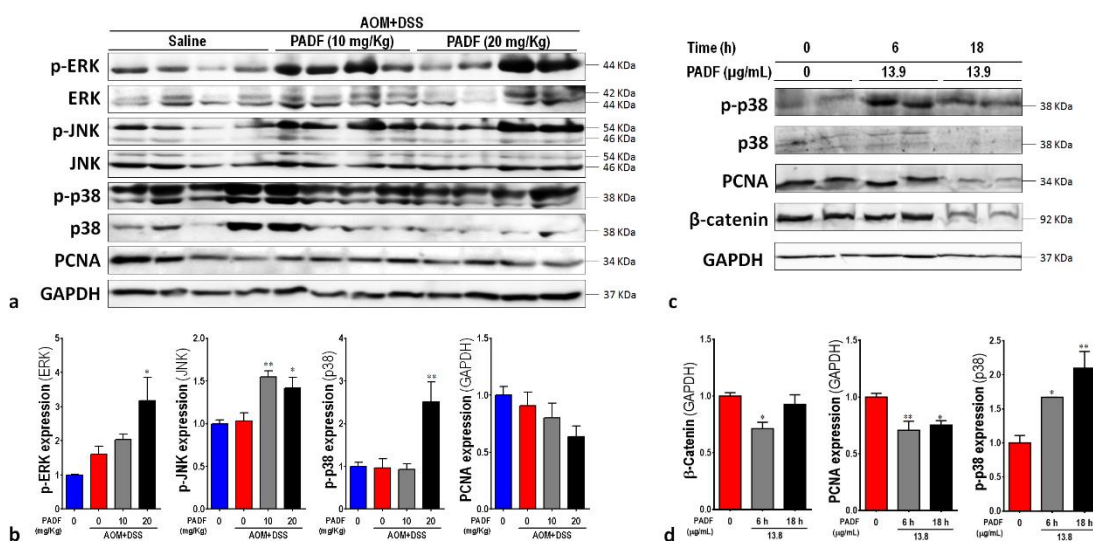


Figura 6. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la progresión de tumores CCR. (**a-b**) Fotografías representativas del análisis Western blot de quinasas activadas por mitógenos - MAPKs (ERK, JNK y p38) y Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en muestras de tejido colónico obtenidas con el modelo AOM-DSS. La expresión relativa de las proteínas estudiadas fue normalizada con la correspondiente proteína fosforilada o con GAPDH como se indica en la figura (**c-d**). Fotografías representativas del análisis Western blot de p38 MAPK, PCNA y β -catenin en células HT-29. La expresión relativa de las proteínas estudiadas fue normalizada con la correspondiente proteína fosforilada o con GAPDH como se indica en la figura. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n=4) y son representativos de al menos tres experimentos independientes (*) P<0.05 y (**) P<0.01 vs. CAC-control o células HT-29 no tratadas.

Conclusión

En síntesis, PADF, fracción activa aislada de los cálices de *P. angulata*, mostró potente actividad citotóxica, anti-tumoral y anti-inflamatoria en diferentes modelos experimentales de CCR, en donde se pudo apreciar que esta fracción disminuyó la proliferación de células malignas a través de inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular, inhibición de citoquinas y modulación de vías de señalización críticas como la de las MAPKs y Wnt/ β -catenin. Esta bioactividad puede relacionarse con el alto contenido de ésteres de sacarosa, metabolitos con reconocida actividad anti-inflamatoria y anti-bacteriana. Estos nuevos hallazgos pueden

impulsar al desarrollo de nuevas investigaciones relacionadas con la caracterización química de PADF a fin de identificar los compuestos responsables de la actividad biológica que, a futuro, puedan proponerse como candidatos terapéuticos para tratar el cáncer colorrectal.

Agradecimientos y fuentes de financiación: los autores agradecen a la Dr. Josefina Zakzuk por su apoyo en el análisis por citometría de flujo, así como a Jennifer Vázquez, Catherine Meza y Laura Ospina por su asistencia técnica en el ensayo de micronúcleos. Esta investigación estuvo financiada por MinCiencias y la Universidad de Cartagena (Contrato 878-2015 código 110772553569 a LF, Convocatoria 647-2014 a DC).

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribuciones de los autores: L. Franco concibió el estudio. Y. Ocampo, D. Caro y J. Castro diseñaron y supervisaron los experimentos. D. Caro y D. Rivera llevaron a cabo los experimentos. Y. Ocampo, D. Caro y L. Franco escribieron el manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

CAPITULO 4. QUINONAS: COMPUESTOS DE RECONOCIDA UTILIDAD PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Como se planteó previamente, el proceso de la identificación de nuevos principios activos o coadyuvantes útiles en el tratamiento del cáncer consta de varias etapas que incluyen identificación de especies vegetales medicinales, elaboración y evaluación biológica de sus extractos, fraccionamiento bioguiado de los mismos, obtención de compuestos activos y creación de rutas de síntesis orgánica para mejorar características farmacológicas y aumentar el rendimiento en su producción. Agotar cada una de estas etapas puede demorar décadas ya que en cada una se presentan retos que deben superarse para poder continuar a la fase siguiente [25]. En este orden de ideas, en el desarrollo de esta tesis doctoral abordaron con diferentes productos. En la primera etapa, exploramos la flora de la Costa Caribe Colombiana con el fin de identificar aquellos extractos de plantas que presentaran actividad biológica *in vitro* y, de 31 extractos identificamos 11 fuentes de compuestos bioactivos frente al cáncer. En lo que se refiere al fraccionamiento bioguiado, escogimos a la especie *P. angulata* e identificamos la fracción activa PADF, cuya actividad biológica se determinó tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Para continuar con la contribución a la identificación de nuevos principios activos o coadyuvantes de la terapia contra el cáncer, en esta etapa de la tesis estudiamos compuestos producto de síntesis orgánica cuya estructura química o núcleo base fue descubierto en una fuente natural. Para ello, se escogieron las quinonas naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (Avicquinone B) y 8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (AKM53) y se profundizó en sus mecanismos de acción biológica, tomando como base lo reportado previamente en [1], en donde se sintetizaron una serie de derivados quinoidales y se evaluaron en cuanto a su actividad anti-proliferativa frente a la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 y fibroblastos dérmicos normales (PCS-201-012), utilizando el método del MTT. Las quinonas se considera una de las familias más importantes de agentes antitumorales en la que se incluyen reconocidos compuestos como la doxorubicina, daunorrubicina, o mitomicina C, actualmente utilizados en clínica [108,109]. Aunque la mayoría de los fármacos antitumorales de este tipo han sido descubiertos de manera empírica, se tiene conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales afectan el crecimiento celular [110,111] y que evidencian el gran potencial de esta clase de compuestos, razones que motivaron la realización de esta etapa de la tesis doctoral. En primera instancia, se evaluó la actividad anti-proliferativa *in vitro* de ambos compuestos sobre un panel de líneas celulares de cáncer humano y en función de los resultados y las prioridades del grupo de investigación se seleccionó la línea HT-29 para profundizar en el estudio de ambos compuestos. La batería de ensayos genotóxicos evaluados (test de Ames, ensayo cometa y ensayo de micronúcleos) demostró que los compuestos no producen efectos mutagénicos. El análisis por citometría de flujo mostró que los derivados quinoidales inducen aumento significativo de la proporción de células apoptóticas (Anexina A5 positivas), así como arresto del ciclo celular en fase G2/M (4N). El análisis de secuenciación de RNA mensajero (RNA-seq), mostró que, de los 12.761 genes evaluados, 491 se expresaron diferencialmente por efecto del tratamiento con AKM53, con 366 genes regulados a la baja (*down-regulated*) y 125 regulados al alta (*up-regulated*); mientras que el tratamiento con Avicquinone B indujo la expresión diferencial de 490 de los cuales 341 genes fueron regulados a la baja (*down-regulated*) y 149 regulados al alta (*up-regulated*). En estos mismos resultados se evidencia además que los derivados quinoidales evaluados, inducen cambios transcripcionales sobre numerosos genes

relacionados con respuesta a agentes externos, vías de señalización de interferón y de citoquinas en el sistema inmune. Por tanto, estos compuestos se presentan como potenciales candidatos para la obtención de nuevos agentes, útiles en la terapia contra el CCR y, nuestro estudio sienta una la base para futuros proyectos encaminados a continuar la elucidación molecular del mecanismo de acción de estos compuestos y el desarrollo de un producto farmacéutico con utilidad a nivel clínico y alientan a continuar su estudio con miras a la obtención nueva análogos más potentes y selectivos. En esta etapa de la tesis doctoral se generaron presentaciones en eventos científicos, y dos artículos publicados en revistas indexadas, los cuales se muestran a continuación.

1. *Transcriptome Changes in Colorectal Cancer Cells upon Treatment with Avicequinone B. Cambios transcriptómicos en células de cáncer colorrectal después del tratamiento con Avicequinone B.*

Daneiva Caro, Yanet Ocampo, David Rivera, Jhoan Piermattey, Ricardo Gaitán, Luis A. Franco. *Transcriptome Changes in Colorectal Cancer Cells upon Treatment with avicequinone B*. Adv Pharm Bull. 2020; 10 (4): 638-647. doi: 10.34172/apb.2020.077

Abstract

Purpose: naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (Avicequinone B), a natural naphthoquinone isolated from the mangrove tree *Avicennia alba*, is recognized as a valuable synthetic precursor with anti-proliferative effect. However, the molecular mechanism involved in its bioactivity has not been investigated. This study aimed to determine the selectivity of avicequinone B against cancer cells and the transcriptomic changes induced in colorectal cancer (CRC).

Methods: the cytotoxic effect against adenocarcinoma-derived cells or fibroblasts was evaluated using MTT assay. In addition, CRC cells were treated with avicequinone B in different settings to evaluate colony-forming ability, cell cycle progression, apoptosis/necrosis induction, and transcriptome response by RNA-seq.

Results: avicequinone B effectively reduced the viability of breast, colorectal, and lung adenocarcinoma cells with IC₅₀ lower than 10 µM, while fibroblasts were less affected. The induction of G2/M arrest and necrosis-like cell death were observed in avicequinone B-treated HT-29 cells. Furthermore, RNA-seq revealed 490 differentially expressed genes, highlighting the reduction of interferon stimulated genes and proliferative signaling pathways (JAK-STAT, MAPK, and PI3K-AKT), as well as the induction of ferroptosis and miR-21 expression.

Conclusion: in short, these results demonstrated the therapeutic potential of avicequinone B and paved the foundation for elucidating its mechanisms in the context of CRC.

Keywords: Avicequinone B, Colorectal cancer, RNA-sequencing, Interferon stimulated genes, Ferroptosis, miR-21

Resumen

Objetivo: naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (Avicequinone B), una naftoquinona natural aislada del manglar *Avicennia alba*, es reconocida como precursor sintético valioso con efecto anti-proliferativo. Sin embargo, el mecanismo molecular involucrado en su bioactividad no ha sido investigado. Este estudio estuvo encaminado a determinar la selectividad de Avicequinone B contra células de cáncer y los cambios transcriptómicos inducidos en células de cáncer colorrectal (CCR).

Métodos: el efecto citotóxico sobre células derivadas de adenocarcinoma o fibroblastos fue evaluado usando el ensayo del MTT. Adicionalmente, las células de CCR fueron tratadas con avicequinone B con el fin de evaluar su efecto sobre la capacidad formadora de colonias, progresión del ciclo celular, inducción de apoptosis/necrosis y cambios transcriptómicos por RNA-seq.

Resultados: Avicequinone B redujo efectivamente la viabilidad de células de adenocarcinoma de mama, colorrectal y pulmonar mostrando CI_{50} menores a 10 μ M, mientras que los fibroblastos fueron poco afectados. Se observó que avicequinone B induce arresto G2/M y necrosis como muerte celular en células HT-29 tratadas con ese compuesto. Además, el análisis de RNA-seq reveló un total de 490 genes diferencialmente expresados, destacándose entre estos la reducción de la expresión de los genes estimulados por el interferón y vías de señalización de proliferación celular (JAK-STAT, MAPK, y PI3K-AKT), así como la inducción de ferroptosis y la expresión de miR-21.

Conclusión: En resumen, estos resultados demostraron el potencial terapéutico de avicequinone B y sentó las bases para continuar con la elucidación de sus mecanismos de acción en el contexto del CCR.

Introducción

Los ecosistemas de manglares ocupan la región intermareal y estuarios de las costas tropicales, típicamente entre los 30° al norte y sur del ecuador¹[112]. Recientemente los manglares han ganado especial atención debido a la singular adaptabilidad/tolerancia que poseen para resistir condiciones ambientales hostiles (por ejemplo, alta salinidad y temperatura, suelos fangosos anaeróbicos, mareas extremas, vientos fuertes), lo que resulta en la producción de compuestos bioactivos novedosos que pueden utilizarse de manera exitosa para tratar enfermedades incluyendo el cáncer^{1,2}[112,113]. Sin embargo, las investigaciones relacionadas con el estudio de los metabolitos extraídos de manglares siguen siendo limitadas. *Avicennia* (Avicenniaceae) es el único género de manglares que crece en todo el mundo, está conformado por ocho especies de diversa importancia ecológica, fitoquímica y etnomedicinal. Dentro de este género, *A. alba*, *A. officinalis* y *A. marina* son consideradas especies valiosas por sus propiedades medicinales y composición química. De hecho, muchos tipos de metabolitos bioactivos ha sido obtenidos de *Avicennia*, tales como flavonoides, taninos, terpenoides, ácidos grasos y naftoquinonas³[114]. Excepcionalmente este género está documentado como una fuente rica en naftoquinonas, las cuales son reconocidas por su actividad antibacteriana, antioxidante así como agentes para quimiopreención y anticancerígenos⁴⁻⁷[2,115–117]. Dentro de estas sustancias, nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (Avicequinone B) y otros derivados estructuralmente relacionados que poseen el anillo furano como nafto[1,2-b]furan-4,5-diona, han demostrado potente actividad citotóxica contra células de cáncer⁸⁻¹¹[118–121]. Avicequinone B fue aislada por primera vez por Ito *et al*⁶[2] en el año 2000 a partir de la corteza de *A. alba* y años después Jia *et al*¹²[122] quien describió su aislamiento a partir de hojas de *A. marina*. Curiosamente, la bioactividad de Avicequinone B fue estudiada ampliamente desde 1994 cuando Koyanagi *et al*¹³[123]

propuso un método confiable de obtención de este compuesto mediante síntesis química, considerándose como un análogo no natural o un simple precursor durante procesos biosintéticos. A partir de entonces, la optimización en el proceso de obtención de Avicequinone B ha sido generador de investigaciones al considerarse como un precursor importante para la síntesis de nuevos derivados con anillo furano-naftoquinonónico¹⁴[124]. En un estudio nuestro encaminado a la optimización de estructuras naftoquinónicas citotóxicas contra el CCR, se identificó a Avicequinone B como un inhibidor efectivo de la proliferación de células HT-29 (adenocarcinoma colorrectal)¹⁵[1]. Por tanto, en este trabajo nos enfocamos a investigar la selectividad de Avicequinone B hacia la inhibición del crecimiento de líneas celulares de adenocarcinoma, así como la exploración de algunos de los mecanismos de acción involucrados en su actividad citotóxica usando la secuenciación del transcriptoma. Nuestros resultados proporcionan evidencia de varios mecanismos novedosos correlacionados con la reducción de un panel de genes inflamatorios, inhibición de la señalización relacionada con la proliferación e inducción de ferroptosis las cuales fundamentan la eficacia *in vitro* de Avicequinone B como fármaco con promisoría actividad anticancerígena CCR.

Materiales y métodos

Compuesto de prueba: Avicequinone B (nafto[2,3-b]furan-4,9-diona) fue sintetizado como previamente describió Acuña *et al*¹⁵[1]. Los datos analíticos confirmaron que la pureza del compuesto obtenido fue >99%. Para los bioensayos, el compuesto fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, USA) y diluido en medio completo en cada experimento.

Cultivo celular: líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (HT-29), pulmonar (A549), prostático (PC-3) y de mama (MDA-MB-231), así como fibroblastos humanos adultos normales dérmicos (PCS-201-012), fibroblastos humanos fetales normales pulmonares (MRC-5) y fibroblastos embrionarios de *Mus musculus* (3T3-L1), fueron obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA) y cultivados tal como se detalla en la sección **Supplementary methods**.

Ensayo de viabilidad celular: la citotoxicidad de Avicequinone B fue evaluada usando el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual esta descrito en la sección **Supplementary methods**.

Ensayo de clonogenicidad: la capacidad de Avicequinone B para suprimir la replicación de células HT-29 y MRC-5 fue confirmada usando el ensayo de clonogenicidad¹⁶[37]. Se cultivaron 750 células/pozo en una placa de 6 pozos por 6h y posteriormente fueron tratadas con el compuesto de prueba (0-16.4 μ M) o vehículo (DMSO) por 48 h. Trascorrido este tiempo, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio suplementado y se dejaron formar las colonias por 7 días. Finalmente, las colonias fueron fijadas y teñidas con cristal violeta 0.5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y contadas usando un estereomicroscopio (EZ4 HD, Leica Microsystems, Singapore).

Análisis del ciclo celular: células HT-29 (2×10^5 células/mL) fueron expuestas a Avicquinone B (8.20 μ M) o vehículo (DMSO) por 48 h. Posteriormente, las células se recolectaron, se lavaron con PBS, se fijaron con etanol frío al 66% y se mantuvieron toda la noche a 4°C. Finalmente, las células fueron teñidas con yoduro de propidio (PI) e incubadas con RNase A, usando el Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (ab139418; Abcam, Cambridge, UK), de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante. El efecto de avicquinone B sobre la distribución del ciclo celular de células HT-29 fue determinado usando citometría de flujo (Dako, Beckman Coulter Inc., CA, USA).

Ensayo de citometría de flujo con Annexin V-SYTOX: se determinó la proporción de células de CCR en Apoptosis/Necrosis usando el Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (ab14086; Abcam, Cambridge, UK). Células HT-29 (2×10^5 células/mL) fueron tratadas con Avicquinone B (8.20 μ M) o vehículo por 48 h. Después, se recolectaron las células y se tiñeron con Annexin V-FITC y SYTOX Green dye para medir la proporción de células vivas, apoptóticas y necróticas mediante citometría de flujo usando un equipo Beckman Coulter Dako Cytomation CyAn ADP Cytometer (Dako, Beckman Coulter Inc., CA, USA).

Extracción y análisis del RNA total: células HT-29 fueron tratadas por 48 h con Avicquinone B (8.20 μ M) o vehículo por 48 h. Posteriormente, se extrajo el RNA total usando el GeneJET™ RNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) siguiendo las especificaciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA fue determinada usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El RNA aislado fue enviado a la Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia) para su análisis; en donde nuevamente rectificaron la pureza y concentración del RNA usando un Fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), mientras que la integridad, medida como número de integridad-RIN, fue determinada usando un Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las muestras tuvieron una concentración variada con valores entre los 11.4 y 97.6 ng/ μ L; con una relación 260/280 por encima de 1.85 y valores de RIN estuvieron entre los 4.2 y 9.0, la mayoría de las muestras tuvieron RIN > 7.

Análisis de RNA-sequencing: la preparación de la biblioteca y la secuenciación se realizó en las instalaciones de MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA). El RNA total de cada muestra (150-500 ng) fue utilizado para la construcción de la biblioteca utilizando el TruSeq™ RNA LT Sample Preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, la validación de las bibliotecas enriquecidas obtenidas a partir de las muestras fue realizada usando el Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y el Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se generaron productos (smear) con tamaños entre 461 y 680 bp. Las bibliotecas fueron normalizadas y se agruparon a concentraciones equimolares (2 nM). Se generaron clústeres en un cBOT (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) usando 5 pM de bibliotecas normalizadas agrupadas. Finalmente, la secuenciación se ejecutó en un HiSeq 2500 durante 300 ciclos (2×150 bp, paired end run) (Illumina, Inc, California, USA). El análisis bioinformático se detalla en **Supplementary methods**.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR): para validar el análisis de RNA-sequencing, se seleccionaron para RT-qPCR seis genes diferencialmente expresados (DEGs, tres up-regulated y tres down-regulated). Los detalles del análisis se describen en **Supplementary methods** y las secuencias de los cebadores (primers) empleados se especifican en la **Table S1**.

Análisis estadístico: cuando fue apropiado, los datos se presentaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos fueron analizados utilizando un test de t student o un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. La significancia estadística se consideró para valores de $P < 0.05$.

Resultados y discusión

Avicquinone B demostró una actividad inhibitoria selectiva frente a células de cáncer: como se reportó recientemente¹⁵[1] Avicquinone B (naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione, **Figura 1A**) demostró una potente actividad citotóxica frente a células de CCR (HT-29) con una concentración inhibitoria (CI₅₀/IC₅₀) de 8.20 \pm 0.06 μ M. De manera similar, el compuesto de prueba afectó la viabilidad de células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231; IC₅₀=6.43 \pm 0.28 μ M), pulmón (A549; IC₅₀=2.71 \pm 0.18 μ M) y próstata (PC3; IC₅₀=11.65 \pm 1.54 μ M) (**Figura 1B**). La selectividad de Avicquinone B fue confirmada usando fibroblastos de pulmón (MRC-5; IC₅₀=21.80 \pm 2.68 μ M), dérmicos (PCS-201-012; IC₅₀=9.12 \pm 0.29 μ M) y murinos (3T3-L1; IC₅₀=10.71 \pm 0.89 μ M). Dado que Avicquinone B y su análogo angular (naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione) se han reportado previamente como potentes agentes citotóxicos frente a células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y de pulmón (A549, H460 y NCI-H460)⁸⁻¹¹[118–121]; continuamos el estudio farmacológico de Avicquinone B utilizando las células de CCR HT-29. El ensayo de clonogenicidad mostró que Avicquinone B a concentraciones citotóxicas (8.20 y 16.40 μ M) inhibió la capacidad de formación de colonias de células HT-29, confirmándose su efectividad frente a células de CCR (**Figura 1C**), a diferencia del efecto observado sobre fibroblastos MRC-5, que a las mismas concentraciones evaluadas en HT-29 se mostraron viables y formaron algunas colonias, sin embargo, el tratamiento con el compuesto de prueba afectó significativamente la tasa de proliferación, lo que generó preocupación sobre su seguridad. Para continuar nuestra investigación sobre las propiedades de Avicquinone B como compuesto con alto potencial para desarrollar nuevos fármacos anti-CCR, se llevó a cabo un conjunto de tres pruebas de genotoxicidad *in vitro* (test de Ames, ensayo de micronúcleos y cometa) cuyos pasos metodológicos se describen detalladamente en **Supplementary methods**. Los resultados permitieron evidenciar que Avicquinone B no produce efectos mutagénicos cuando se utiliza a la concentración citotóxica probada (IC₅₀=8.20 μ M) (**Figure S1**).

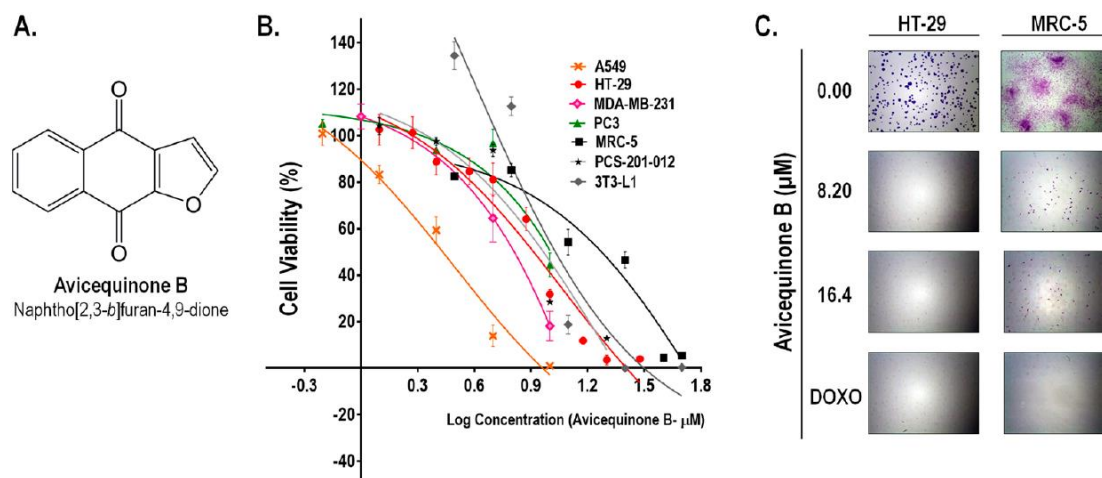


Figura 1. Avicequinone B inhibe la viabilidad y proliferación de células de cáncer. (A) Estructura química del compuesto de prueba. (B) La viabilidad de varias células de adenocarcinoma humano (A549, HT-29, MDA-MB-231 y PC-3) fue selectivamente reducida en comparación a la de los fibroblastos normales (MRC-5, PCS-201-012 y 3T3-L1). El porcentaje de células viables en el grupo control fue del 100%. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes y se expresaron como la media \pm EEM (n=6-11 datos por grupo). (C) La capacidad de formación de colonias de células HT-29 fue suprimida completamente por Avicequinone B (8.20 y 16.40 μ M) mientras que los fibroblastos fueron afectados parcialmente. Como fármaco quimioterápico de referencia se utilizó doxorubicina (DOXO). Fotografías representativas de las colonias se muestran a un aumento de 8X.

El efecto anti-proliferativo de Avicequinone B ocurre por inducción de arresto en la progresión del ciclo celular y muerte celular: como se aprecia en la **Figura 2A**, el tratamiento con Avicequinone B, ocasionó un incremento significativo en la proporción de células 4N (en fase G2/M) de $19.58 \pm 2.79\%$ (control-0 μ M) a $34.90 \pm 3.98\%$ (Avicequinone B-8.20 μ M), mientras que las poblaciones celulares con 2N (fase G1) y 2N-4N (fase S) tuvieron una tendencia a la disminución. Por tanto, con estos resultados podemos decir que el compuesto de prueba desencadena un arresto del ciclo celular en la fase G2/M de células HT-29; lo cual concuerda con lo reportado previamente por Tseng et al⁹[119] quien observó el mismo efecto pero en células K562 (leucemia). Por otro lado (**Figura 2B**), la tinción con Annexin V-FITC y SYTOX demostró que Avicequinone B (8.20 μ M) aumenta la proporción de células HT-29 con fluorescencia verde intensa (indicativo de necrosis) sin aumentar de manera significativa la proporción de células apoptóticas (fluorescencia verde). Este resultado difiere al obtenido por Prateep et al⁸[118], quien reportó la inducción de apoptosis y no de necrosis en células H460 tratadas con Avicequinone B, discrepancia que puede explicarse por las diferencias en el tipo y diseño experimental empleado, además de la concentración utilizada del compuesto de prueba (valor menor a la IC₅₀ reportada).

La secuenciación del transcriptoma reveló que Avicequinone B promueve la muerte celular principalmente por reducción de la expresión de genes estimulados por IFN: para evaluar el mecanismo involucrado en la bioactividad de Avicequinone B frente al CCR, se llevó a cabo un estudio comparativo RNA-seq basado en el análisis del transcriptoma de células HT-29 tratadas con vehículo (control) o una concentración citotóxica del compuesto de prueba (8.20

μM). Los datos de RNA-seq mostraron similitudes en las lecturas, velocidad de mapeo, contenido de GC en todas las muestras analizadas (**Table S2**, $n=3$): En el experimento, de los 12761 genes estudiados, 490 genes fueron diferencialmente expresados (**Figura 3A**). Estos se obtuvieron usando un umbral (threshold) de 0.05 para la significancia estadística (p - y FDR $-q$ - values) y un log fold change de expresión con un valor absoluto de al menos 0.5.

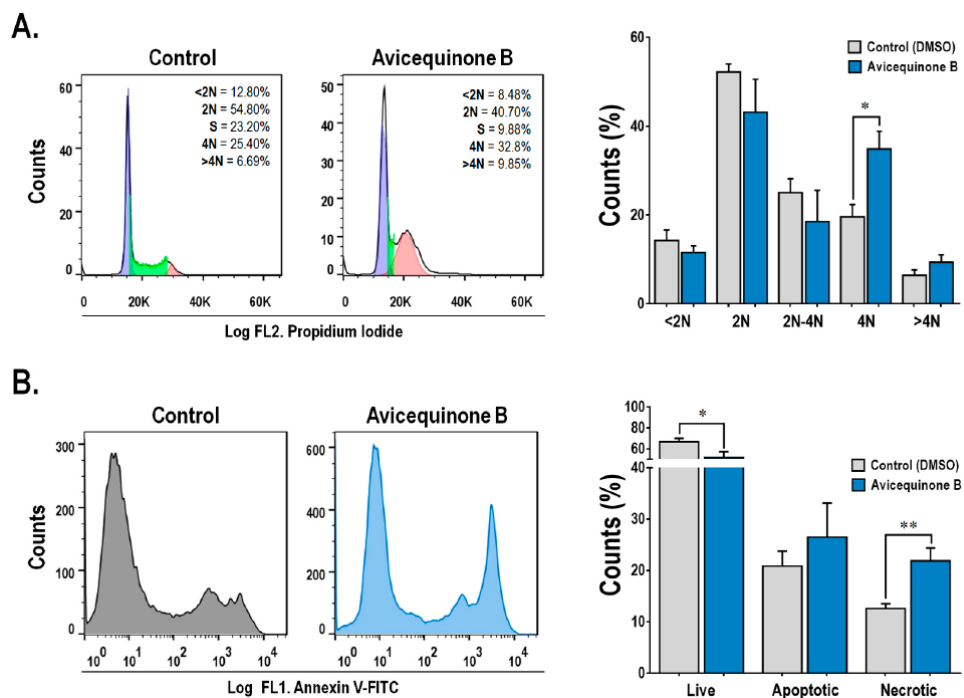


Figura 2. Avicquinone B induce arresto del ciclo celular y necrosis como muerte celular. Los datos de citometría de flujo mostraron que (A) células HT-29 tratadas por 48 h con Avicquinone B (8.20 μM) detienen su ciclo celular en fase G2/M (4N) y (B) mueren por necrosis. Los histogramas característicos muestran el número de células (eje vertical) vs. el contenido de DNA marcado con PI (yoduro de propidio) o Annexin-V/Sytox Green (eje horizontal – Canal FL2 y FL1, respectivamente). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes y se expresan como la media \pm EEM ($n=3-10$ datos por grupo). Las diferencias significativas respecto al grupo control y se indican para * $P<0.05$ y ** $P<0.01$.

Avicquinone B reguló significativamente a la baja (*down-regulated*) la expresión de 341 genes y 149 genes fueron regulados al alta (*up-regulated*) (**Table S3**). Para validar el análisis del transcriptoma (RNA-seq), se midieron los niveles de seis genes diferencialmente expresados (3 *up-regulated*: SPRR1B, AKAP12, CYP1A1 y 3 *down-regulated*: IFITM1, IFI44L, EPSTI1) utilizando RT-qPCR. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los obtenidos en el RNA-seq, mostrando una correlación significativa (*least-squares linear regression*, $P<0.05$; $R^2= 0.909-0.935$; **Figure S2**), validando así el análisis. Los niveles de los genes diferencialmente expresados fueron integrados dentro de una red de interacción proteína-proteína construido con STRING database (*interaction score* >0.4). Los genes ubicados en el eje central se identificaron por análisis topológico usando Cytoscape Network Analyzer. Como se muestra en la **Figura 3B**, la mayoría de los nodos (círculos rojos) de mayor tamaño o con mayor grado de interacción (ISG15, STAT1, OAS1, OAS2, OAS3,

MAPK3, EGFR, MX1, OASL y IFIT1) son genes regulados por interferón (IRGs) y su expresión fue reducida por el tratamiento con Avicequinone B. Dentro de estos genes, STAT1, ISG15, MAPK3, y en menor medida OAS2 presentaron puntuaciones de centralidad (*centrality scores*) más altos. Además, cerca del 39% de los genes regulados a la baja (*down-regulated*) están controlados por Interferón tipo I o Tipo II (**Figura 3C**), según la clasificación en la base de datos de Interferome. Asimismo, dentro del top 10 de genes regulados a la baja (*down-regulated*) (**Table S4**), siete se identificaron como parte del sistema IRGs (IFITM1, IFI44L, RSAD2, EPSTI1, TNNC1, GPRC5B y CMPK2).

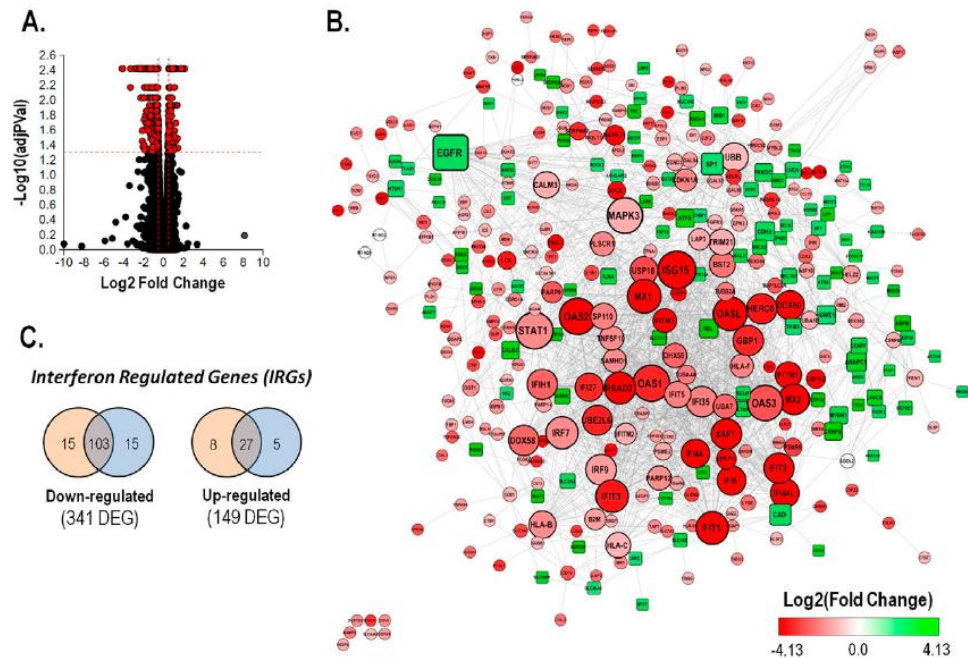


Figura 3. El tratamiento con Avicequinone B redujo las señales transcriptómicas inflamatorias de células HT-29 por reducción de la expresión de genes regulados por interferón (IRGs). El análisis transcriptómico fue desarrollado por medio de RNA-seq. **(A)** El Volcano plot presenta los cambios de expresión de mRNA de células HT-29 tratadas con Avicequinone B comparadas con las del grupo control. Todos los genes medidos (puntos) están representados en términos de los cambios de expresión calculados (eje x) y la significancia del cambio (eje y). La línea punteada representa los thresholds utilizados para seleccionar los genes diferencialmente expresados (DEGs): 0.5 para cambios en la expresión y 0.05 para significancia. Los DEGs están representados como puntos rojos (490). **(B)** La red de interacción proteína-proteína de los DEGs fue construida utilizando STRING database (score=0.4) y analizada usando Cytoscape. Cada nodo representa una relación gen/proteína, los bordes representan la interacción entre gen/proteína, el tamaño de los nodos es proporcional al grado del nodo, la forma indica la dirección de la expresión (cuadros: *up-regulation* y círculos: *down-regulation*) y el color representa el $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$. **(C)** Número de genes tipo I (naranja) y tipo II (azul) regulados por interferón (IRGs) que fueron identificados en la lista de DEGs regulados por Avicequinone B usando Interferome database, depurados por especie (*Homo sapiens*) y sistema (tracto gastrointestinal).

Paralelamente, el análisis del top 10 de genes *up-regulated* por Avicequinone B (**Table S5**) mostró que algunos están asociados con el desarrollo de la envoltura cornificada, la epidermis y las uniones celulares (SPRR1B, SCEL y TNC), otros están relacionados con la desintoxicación (CYP1A1) y la supresión tumoral en CCR (AKAP12). Adicionalmente, el tratamiento con Avicequinone B favoreció la expresión de genes ligados a mRNA de baja

abundancia en células que conforman tejidos afectados extraídos de pacientes con CCR (SLC7A11, SCEL, LRRN4, y SERPINA3). En este análisis transcriptómico, se observó además que el tratamiento con Avicquinone B de las células HT-29 afectó la expresión de dos marcadores de metástasis de CCR: HOPX (*down-regulated*) y TNC (*up-regulated*), lo cual pudo ocurrir probablemente como respuesta de supervivencia de celular.

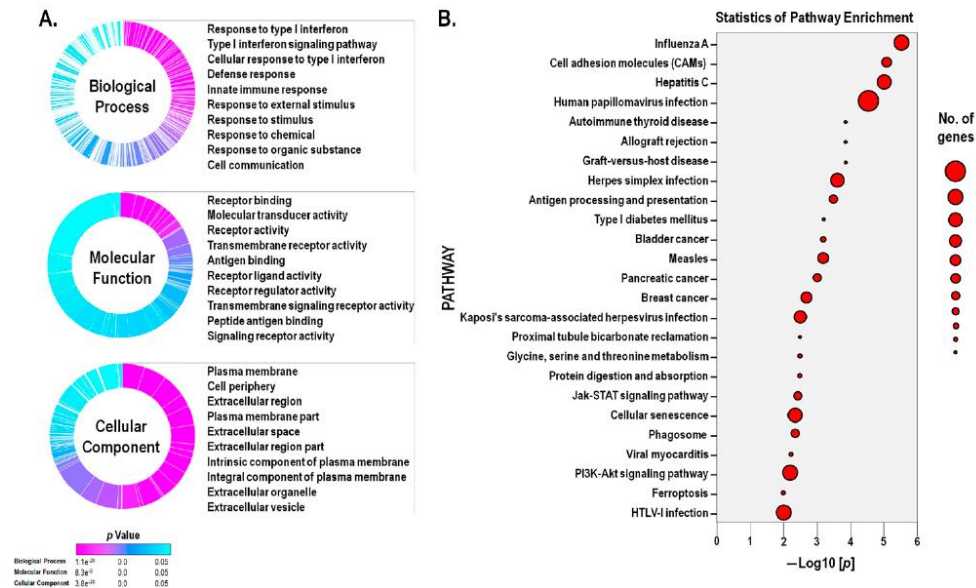


Figura 4. Avicquinone B altera la expresión de genes asociados con la supervivencia celular, proliferación, unión celular y señalización, respuesta a interferón y virus, vías del cáncer y ferroptosis. (A) Genes diferencialmente expresados (DEGs) entre células HT-29 tratadas con Avicquinone B (8.20 μ M) y control (vehículo), estos fueron categorizados dentro de tres dominios: procesos biológicos, función molecular y componentes celulares mediante ontología de genes (GO) y análisis de enriquecimiento utilizando el software iPathway online; se consideraron $p < 0.05$ para los valores de cortes de p corregidos en comparaciones múltiples usando FDR y Bonferroni. Las gráficas GO resumen los términos sobreexpresados para cada dominio. Cada sección de la gráfica representa un término diferente, la altura de la sección es proporcional al número de DEGs y la significancia del enriquecimiento se visualiza usando una escala de color, el azul cian representa los menos significativos y el magenta los más significativos. (B) Gráfico de dispersión de las veinticinco vías significativamente más enriquecidas para los DEGs según la categorización del software iPathway online. Las vías (eje-x) están clasificadas de acuerdo a su significancia (eje-y) las cuales se representan en términos del log (base 10) negativo del valor de P (sin corregir). El tamaño de los puntos representa el número de DEGs.

Los datos de la expresión de genes fueron estudiados en el contexto de vías, ontología de genes (GO) y miRNAs usando el software iPathway online. Los resultados mostraron que 49 vías moleculares fueron impactadas significativamente. En el análisis de los p-values sin corregir, se encontró un enriquecimiento significativo de 1684 términos GO y 5 miRNAs. En la **Figura 4A**, se observan los términos GO enriquecidos que se relacionan con procesos biológicos, función molecular y componente celular, enfatizándose en los 10 términos GO que estaban enriquecidos significativamente. El tratamiento con Avicquinone B induce enriquecimiento de términos GO relacionados con el inicio y progresión del cáncer, tales como proliferación, diferenciación y migración celular, angiogénesis, regulación de la muerte celular programada y apoptosis. Avicquinone B induce además el enriquecimiento

de términos GO relacionados con señalización y adhesión entre células, el ensamble de la membrana plasmática y espacio extracelular, respuesta a fármacos y a estrés oxidativo. En particular, el tratamiento con el compuesto de prueba produjo la expresión diferencial de genes asociados a términos de la respuesta inmune que produce a través de la vía de señalización de interferón (IFN) y procesos de respuesta a virus. Además, el análisis de impacto reveló que de las 25 vías afectadas (**Figura 4B**); 8 están relacionadas con infecciones virales (influenza A, hepatitis C, infección por virus del papiloma humano, infección por herpes simple, sarampión, sarcoma de Kaposi asociado a infección por herpes, miocarditis viral e infección por HTLV-I). Esta asociación característica de Avicequinone B con términos y vías relacionadas con la respuesta inmune a virus se explica por la regulación a la baja (*down-regulation*) de los IRGs, descrita en párrafos anteriores.

El tratamiento con Avicequinone B impactó significativamente vías relacionadas con otros tipos de cáncer, tales como KEGG:05219 (cáncer vesical), KEGG:05212 (cáncer de páncreas) y KEGG: 05224 y de mama (KEGG: 05224) (**Figure S4**). Estas vías comparten una expresión diferencial de genes relacionados con la proliferación celular, diferenciación, migración (ERK y EGFR) y progresión del ciclo celular (p21 y E2F). Curiosamente, el compuesto de prueba reguló a la baja (*down-regulated*) genes que pertenecen a la familia WNT y oncogenes (FGFR3 y HES1), mientras que reguló al alta (*up-regulated*) el gen supresor de tumor BRCA2. El análisis de vías genéticas también mostró que Avicequinone B impactó aquellas relacionadas con el desarrollo y homeostasis (JAK-STAT-KEGG:04630) (**Figura 5A**); regulación de la muerte celular (ferroptosis-KEGG:04216) (**Figura 5B**); interacciones celulares (moléculas de adhesión-KEGG:04514); proliferación y supervivencia celular (PI3K/AKT-KEGG:04151 y MAPK-KEGG: 04010) (**Figures S5 y S6**).

De manera general, los resultados sugieren que los IRGs pueden desempeñar un papel regulador central en la bioactividad de Avicequinone B. En las últimas décadas, la idealización de los IFNs, especialmente del INF- γ como guardián inmunológico contra enfermedades neoplásicas malignas ha cambiando¹⁷[125]. De hecho, los IFNs actúan directamente sobre las células de cáncer inhibiendo la proliferación, modulando la apoptosis, desarrollando la expresión antigénica y regulando al alta (*up-regulated*) la expresión de moléculas inmunológicas que interactúan complementariamente con células del sistema inmunológico que inhiben células inmunosupresoras y activan macrófagos asociados a tumores (TAMs)¹⁸[126]. Sin embargo, al igual que la mayoría de las citoquinas, los IFNs inducen un mecanismo de *feedback* inhibitorio para moderar la magnitud de la respuesta inmune evitando el daño tisular, por lo tanto, en un escenario donde los sistemas de supresión de respuesta superen a los mecanismos activadores, los IFNs podrían favorecer a la generación de señales anti-apoptóticas y relacionadas con proliferación en las células de un tumor, proporcionando de esta manera una ventaja en la supervivencia. De hecho, en algunos tumores el IFN- γ induce en células tumorales y en TAMs la expresión de receptores inhibitorios como el ligando 1 de muerte celular programada (PDL1), mientras que en células dendríticas induce la expresión del supresor de la señal de citoquinas 2 (SOCS2)¹⁹[127]. En concordancia con lo anterior, hay algunos estudios que demuestran la asociación entre la sobreexpresión de IRGs y aparición de resistencia farmacológica en células tumorales.

El sorprendente papel que ejercen los IFNs y los IRGs como importantes actores en la progresión y resistencia de células de cáncer ha despertado gran interés, especialmente en el contexto del CCR, debido a que cada vez hay más evidencia que las células y tejidos afectados extraídos de pacientes con la enfermedad poseen una sobreexpresión de IRGs cuando se comparan con muestras de células y tejidos normales. Por ejemplo, algunos IRGs tales como CMPK2^{20,21}[128,129], IFITM1²²⁻²⁶[130-134], IFITM2^{22,27}[130,135], IFITM3^{22,28}[130,136], IRF2²⁹[137], ISG15³⁰[138], MX1^{31,32}[139,140] y PLSCR1³³[141], han sido propuestos como marcadores de diagnóstico, agresividad y pronóstico de CCR. De manera interesante, el tratamiento de células HT-29 con Avicequinone B disminuyó la expresión de varios IRGs relacionados con CCR (CMPK2, IFIT1, IFITM1, IFITM2, IFITM3, ISG15 y PLSCR1) y otros IRGs relacionados con cáncer en general (IFI27, IFIT2, IFIT3, IRF7, IRF9 y STAT1). Aunque en muchos casos la fuente celular de los IFNs o IRGs no ha sido bien definida, las células del epitelio intestinal juegan un papel importante como productores de citoquinas inflamatorias (incluyendo IFNs) que estimulan la respuesta antiviral, dentro de muchas otras funciones celulares³⁴[142] y, se especula que su producción sostenida podría iniciar y mantener el crecimiento tumoral. En este sentido, algunos autores como Wagner *et al*³²[140] han identificado que la elevada expresión de genes inflamatorios regulados por IFN (por ejemplo, IFIT1, MX1, IFI44L, entre otros) es un factor clave que se encuentra asociado con la resistencia intrínseca o adquirida de células epiteliales de CCR KRAS-mutant hacia inhibidores de mitogen-activated protein kinase (MEKi), lo que explica la falla clínica que presentaron los fármacos representantes de este grupo como el trametinib, para tratar KRAS-CCR y BRAF-CCR; mientras que este mismo fármaco fue exitoso para tratar el melanoma BRAF-mutant, por lo que sus datos experimentales confirmaron que el ambiente inflamatorio intrínseco en el colon se intensifica con KRAS y quimioterapia, resultando en un microambiente tumoral gobernado por persistentes eventos de transcripción de IFN inflamatorios que proveen de resistencia a células de CCR, permitiendo la supervivencia y la proliferación. Por tal razón, se consideran exitosos los tratamientos que suprimen los IRGs que posean efecto anti-proliferativo tanto *in vivo* como *in vivo* (inhibidores de bromodominio).

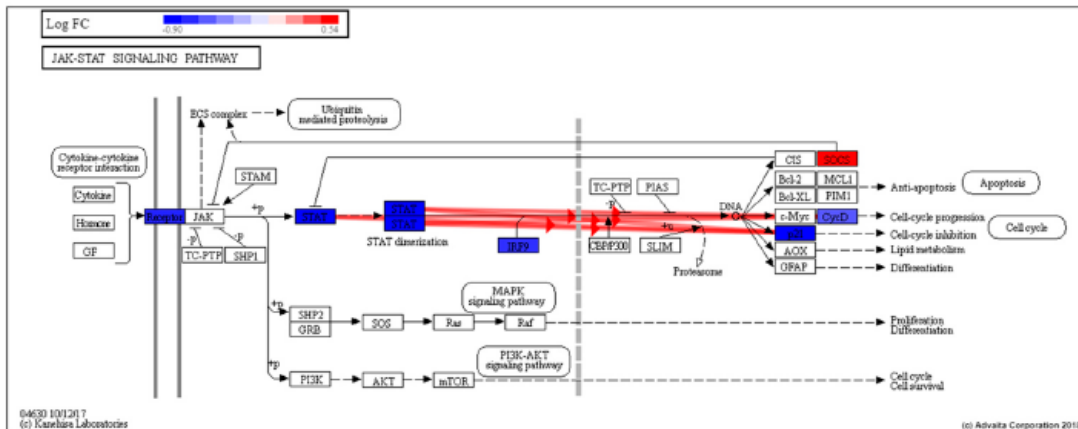
En este mismo sentido, la efectiva citotoxicidad frente a células HT-29 que produce Avicequinone B, involucra abundante inhibición de la expresión de IRGs, acompañada de un impacto significativo sobre la vía canónica Janus kinase-signal transducer (JAK) y la vía de señalización del activador de la transcripción (STAT), ambas activadas por IFNs y otras citoquinas (**Figura 5A**). En células normales, la activación de la vía de señalización JAK-STAT es corta y rápida, mientras que su activación o sobreexpresión constitutiva conduce a transformación oncogénica, invasión por parte de células tumorales y metástasis³⁵[143]. En particular, se ha reportado una elevada expresión o activación de JAK, STAT, IRF9, así como la inhibición de las proteínas supresoras de la señal de citoquinas (SOCS), para varios tipos de cáncer incluyendo el CCR³⁶⁻³⁹[144-147]. En células HT-29, el tratamiento con Avicequinone B redujo significativamente la expresión de varias proteínas involucradas en esta vía de señalización, desde el receptor hasta genes blanco, induciendo además la expresión de SOCS. Notablemente, las naftoquinonas que se dan en las fuentes naturales que están estructuralmente relacionadas con Avicequinone B (por ejemplo, las furano-

naftoquinonas sustituidas), han sido reportadas recientemente como inhibidores de la STAT3 con fuerte actividad anti-proliferativa⁴⁰[148], lo que soporta nuestros hallazgos. No obstante, la posible inhibición directa o a través de reguladores de STAT por parte de Avicequinone B debe ser confirmada. En general, los resultados indican que la Avicequinone B inhibe significativamente la respuesta de JAK-STAT-IRGs, lo que resulta en una regulación a la baja (*down-regulation*) de IRGs como un importante mecanismo de actividad anti-proliferativa frente células HT-29. Además, Avicequinone B impactó significativamente otra vía de señalización relacionada con la proliferación celular y supervivencia tales como phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/serine-threonine kinase (AKT) y mitogen activated protein-kinase (MAPK). En este mismo sentido, se ha identificado a la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) como un importante blanco molecular suprimido por Avicequinone B. Notablemente la activación y expresión de ERK está involucrada en la respuesta celular frente a estímulos ambientales, regulando así el ciclo y diferenciación celular y la senescencia, lo que es crítico para la iniciación y progresión del cáncer (**Figure S4**). En este contexto, Prateep *et al*⁸[118], demostró que la inhibición de la fosforilación de ERK por parte de Avicequinone B es un importante mecanismo de acción involucrado en la inducción de la muerte celular programada por desprendimiento de la matriz celular adyacente, conocida también como anoikis, en células de cáncer pulmonar. En conjunto, toda la evidencia experimental recolectada demostró que la vía de señalización relacionada con ERK posee un importante rol en el efecto citotóxico del compuesto de prueba frente a células de cáncer.

Otra importante vía impactada por Avicequinone B fue la relacionada con el proceso de ferroptosis, un tipo de muerte celular programada no apoptótica no necrótica oxidativa dependiente de hierro, que involucra una peroxidación lipídica catalizada por hierro. La ferroptosis puede ser inducida por dos clases de sustancias, las de clase 1 o inhibidores del cystine/glutamate antiporter (sistema X_c^- SLC3A2/SLC7A11) que reduce el contenido de glutatión (GSH) y, las de clase 2 o inhibidores de la glutatión peroxidasa 4 (GPx4)⁴¹[149]. Al observar nuestros resultados (**Figura 5B**) se puede afirmar que la muerte celular inducida por Avicequinone B se da como consecuencia de tres sucesos; (1) disminución de la función del sistema X_c^- (lo que disminuye la reserva de GSH e induce SLC3A2/SLC7A11) o (2) inducción de estrés oxidativo a través de reacciones redox con una consecuente disminución de las reservas de GSH y sobreexpresión de glutamato cisteína ligasa (GLC). Tanto (1) como (2) están acompañados de un tercer suceso (3) que corresponde a un incremento de hierro intracelular por regulación a la baja (*down-regulation*) de LC3A y regulación al alta (*up-regulation*) de los pseudogenes de ferritina (FTH1P10 y FTH1P20). Cabe anotar que Avicequinone B cambia la expresión de SLC7A11, SLC3A y LC3 hacia la dirección opuesta a las alteraciones encontradas en CCR⁴²⁻⁴⁴[150–152]. Adicionalmente, Avicequinone B también redujo la expresión de HSPB1 (conocida también como HSP-27), una proteína de shock térmico asociada a resistencia a quimioterapia y mal pronóstico en CCR^{45,46}[153,154]. Curiosamente, HSPB1 protege a las células del estrés oxidativo por reducción de la captación celular de hierro^{47,48}[155,156]; así mismo, su supresión sensibiliza células cancerosas (HeLa, U2OS y LNCaP) y xenoinjertos (xenografts) humanos en modelos murinos para inducir ferroptosis por erastina⁴⁹[157]. Sumado a los resultados obtenidos en el análisis del

transcriptómico, el aumento de la entrada de SYTOX Green, un colorante de ácidos nucleicos impermeable a la membrana que marca a células con rupturas de membranas plasmáticas, es un hecho consistente con la inducción de ferroptosis, como previamente describió Kim *et al*⁵⁰[158]. Por tanto, nuestros resultados sugieren que Avicquinone B induce ferroptosis como mecanismo novedoso de inhibición de la proliferación celular.

A.



B.

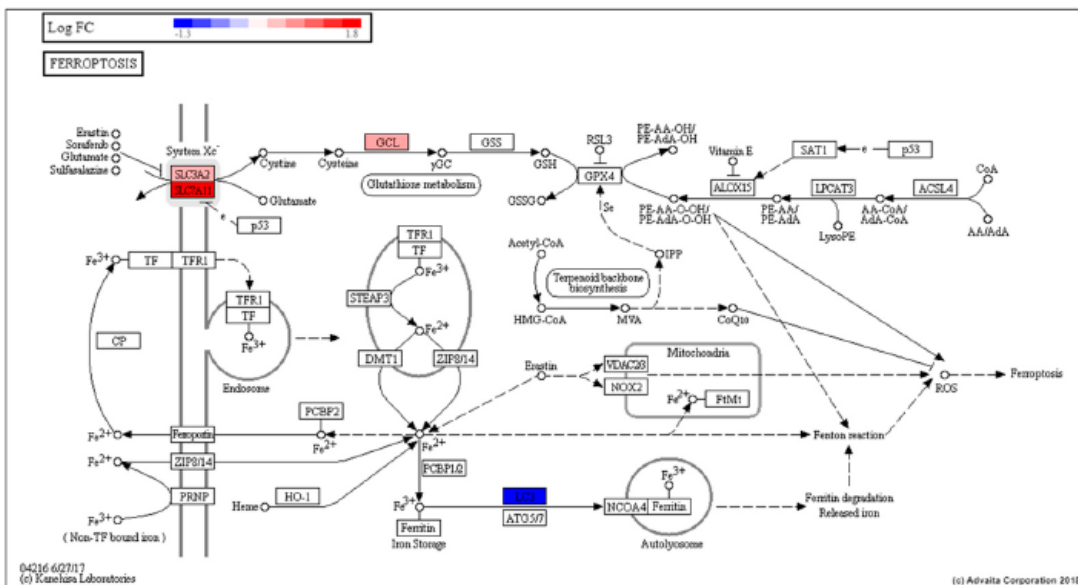


Figura 5. Las vías de señalización JAK-STAT y ferroptosis son importantes para la citotoxicidad de Avicquinone B sobre células HT-29. El tratamiento con Avicquinone B (8.20 μM) impacta significativamente la expresión de genes involucrados en las vías de señalización JAK-STAT y ferroptosis, ambas incluidas en el grupo de las 25 vías más impactadas. (A) La inhibición de la vía JAK-STAT puede explicar la marcada supresión de genes regulados por interferón (IRGs); (B) mientras que la muerte celular a través de ferroptosis se asocia con el incremento de la captación de Sytox y estrés oxidativo inducido por el compuesto de prueba. El análisis de impacto fue desarrollado usando el software iPathwayGuide online. El mapa de calor ubicado en la parte superior izquierda muestra el Log₂ fold change (LogFC), donde el color azul indica genes regulados a la baja (*down-regulated*) y el color rojo indica genes regulados al alta (*up-regulated*). Solo se muestran aquellos genes que bajo nuestro criterio presentan una importante expresión diferencial ($\text{Log}_2(\text{fold}) \geq 0.5$, $P \text{ value} \leq 0.001$ y $q\text{-value} \leq 0.05$). Las flechas en negra resaltadas en rojo indican cascadas afines o relacionadas.

De manera alternativa, con base en el enriquecimiento de genes blanco diferencialmente expresados a la baja (*down-regulated*), el análisis de los datos de expresión génica predijo la presencia de 5 miRNAs (hsa-miR-590-5p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-329-3p; hsa-miR-362-3p y hsa-miR-1306-5p). Dentro de estos, hsa-miR-21-5p mostró ser una importante diana molecular de Avicequinone B. La predicción que involucra a este miRNA podría aparecer como un efecto secundario adverso del tratamiento con Avicequinone B, ya que es un miRNA oncogénico bien caracterizado en CRC [159], sin embargo, también podría indicar que el compuesto de prueba está induciendo estrés celular severo que podría estimular su producción como mecanismo compensatorio⁵²[160]; o que Avicequinone B podría estar promoviendo una inducción directa de miR-21-5p que sensibiliza las células HT-29 a la muerte. Esta última afirmación está respaldada por evidencia experimental previamente descrita, en donde se demuestra que células de CCR exhiben una mayor sensibilidad al tratamiento de quimiorradiación por sobreexpresión de miR-21-5p⁵³[161]. Sumado a esto, la berberina (un alcaloide de isoquinolina natural) suprimió el crecimiento e indujo apoptosis en las células HepG2 (cáncer hepático), a través de la sobreexpresión de miR-21⁵⁴[162].

Conclusión

En resumen, nuestros datos demostraron el efecto citotóxico de Avicequinone B, una furano-naftoquinona natural de *Avicennia alba*, y su selectividad frente a varias líneas celulares de adenocarcinoma, incluidas las células de CCR HT-29. En esta línea celular, el efecto anti-proliferativo del compuesto de prueba fue inducido por arresto del ciclo celular en G2/M y necrosis como muerte celular por inducción de la expresión de genes anti-inflamatorios, con supresión de IRGs probablemente por el bloqueo de la vía JAK-STAT-IRGs, combinada con la inhibición de la señalización de la proliferación, sumado a la inducción de ferroptosis y expresión de miR-21. Tomados en conjunto, estos resultados proporcionan información acerca de nuevos mecanismos implicados en el potencial efecto anti-cáncer de Avicequinone B, así como otras naftoquinonas sustituidas y alientan a la realización de estudios adicionales que permitan validar su actividad en modelos *in vivo*.

Aspectos éticos: no aplicables.

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos y fuentes de financiación: esta investigación estuvo financiada por MinCiencias y la Universidad de Cartagena (Contrato 474-2012 código 110756933930 a LF y RG, Convocatoria 647-2014 a DC). Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena por su valioso apoyo en la citometría de flujo, así como también a Carlos Rojas, Julián Nova, Mauro Narvárez y Jesús Cantillo por su ayuda con la evaluación de la genotoxicidad.

Supplementary Materials: Supplementary file 1 contiene supplementary methods, Tables S1-S5 y Figures S1-S6.

2. *A promising naphthoquinone [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] exerts anti-colorectal cancer activity through ferroptosis and inhibition of MAPK signaling pathway based on RNA sequencing. Una naftoquinona prometedor [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] ejerce actividad frente al cáncer colorrectal a través de ferroptosis e inhibición de la vía de señalización de las MAPK basándonos en resultados del RNA sequencing.*

Daneiva Caro, David Rivera, Yanet Ocampo, Klaus Müller, Luis A. Franco. *A promising naphthoquinone [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] exerts anti-colorectal cancer activity through ferroptosis and inhibition of MAPK signaling pathway based on RNA sequencing.* Open Chemistry 2020; 18: 1242-1255. doi: 10.1515/chem-2020-0170

Abstract

Naphthoquinones are naturally occurring metabolites with recognized anti-cancer potential but limited clinical application. This study investigated the molecular mechanism of 8-hydroxy-2-(2-thenoyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compound 1), a new candidate for colorectal cancer (CRC) treatment, using different experimental settings: MTT, clonogenic, wound healing, and cell cycle assays; as well as RNA sequencing. Naphthoquinone 1 selectively reduced the viability and migration of HT-29 cells by G2/M arrest and changes in their transcriptome signature with significant effect on cellular survival, proliferation, angiogenesis, response to interferon, oxidative stress, and immune response. Impact analysis identified ferroptosis and MAPK pathways as significantly affected. In summary, our results suggest that 1 induces the selective death of CRC cells by inducing oxidative stress, ferroptosis, and MAPK inhibition.

Keywords: naphthoquinones, HT-29, transcriptomics, pharmacological targets, molecular mechanisms

Resumen

Las naftoquinonas son metabolitos naturales con un reconocido potencial anti-cáncer pero con aplicación clínica limitada. Este estudio investigó el mecanismo molecular de 8-hydroxy-2-(2-thenoyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compuesto 1), un nuevo candidato para el tratamiento del cáncer colorrectal (CCR), usando una batería de experimentos: ensayo de MTT, clonogenicidad, cicatrización (wound healing) y análisis del ciclo celular, así como también, secuenciado transcriptómico (RNA sequencing). El Compuesto 1 redujo selectivamente la viabilidad y la migración de células HT-29 induciendo arresto G2/M y cambios en su transcriptoma con un efecto significativo sobre la supervivencia y proliferación celular, angiogénesis, respuesta a interferón, estrés oxidativo y la respuesta inmune. El análisis de impacto reveló que las vías de señalización de la ferroptosis y la de

las MAPK fueron significativamente afectadas. En resumen, nuestros resultados sugieren que el Compuesto 1 induce la muerte celular selectiva de células CCR por inducción de estrés oxidativo, ferroptosis e inhibición de las MAPK.

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad potencialmente mortal, documentada a nivel mundial como el tercer tipo de cáncer más diagnosticado y la cuarta causa de muerte por esta enfermedad. Históricamente, el CCR ha afectado regiones con alto índice de desarrollo humano como Norteamérica y países europeos, en donde las tasas de incidencia y mortalidad se han ido estabilizando o disminuyendo, en países de ingresos medios y bajos estas tasas han ido aumentando, especialmente en países de Centro y Suramérica^[1,2][163,164]. A la gravedad del CCR se le suman los cambios socioeconómicos de estas regiones, por lo que es importante mejorar las opciones de tratamiento disponibles y especialmente la accesibilidad a medicamentos que mejoren rápidamente las condiciones del paciente. En este escenario, los productos naturales han recibido especial atención para prevenir o tratar el CCR debido a la efectividad que han mostrado, la poca toxicidad que generan y el fácil acceso a ellos^[3][165]. Dentro de los compuestos naturales, las naftoquinonas (NQs) se muestran como metabolitos interesantes debido a sus propiedades estructurales y biológicas ya comprobadas científicamente. De hecho, las plantas medicinales que contienen NQs como las *Tabebuia spp.* (conocidas comúnmente como lapacho, pau-d'arco, roble, o guayacán), son empleadas en Suramérica por sus propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antineoplásicas. Además, estudios dirigidos por el National Cancer Institute (NCI-USA) realizados hace casi cuatro décadas, fomentaron la importancia clínica de las NQs, lo que despertó el interés en su investigación para identificar rutas de obtención ya sea a partir de su fuente natural o por vía sintética, con especial énfasis en las que presentaran actividad anti-proliferativa sobre varias líneas celulares de cáncer humano (melanoma, linfoma, pulmón, de mama y CCR)^[4][166]. En el caso del CCR, se han identificado NQs bioactivas promisorias incluyendo 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (plumbagin), 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone), 5,8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthoquinone (shikonin) y β -lapachone. A pesar de la evidencia experimental, la aplicación clínica de los derivados de NQ ha sido limitada, principalmente debido a sus efectos secundarios graves e incluso potencialmente mortales^[5][167]. Estudios recientes han demostrado que las modificaciones químicas realizadas al núcleo NQ ha permitido la obtención de nuevos compuestos que son activos y seguros. En un trabajo realizado previamente, describimos que la presencia de un anillo del tipo furano o tiofeno en el esqueleto naftoquinónico incrementa la citotoxicidad y selectividad contra células de CCR, lo que permitió la identificación de la 2-thienyl-8-hydroxynaphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compuesto 1), el cual fue el derivado más potente frente a células HT-29 de la serie evaluada, produciendo pocos efectos nocivos sobre fibroblastos normales^[6][1]. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en el efecto citotóxico del Compuesto 1, así como el de las NQs en general, aún no están claros. En este trabajo, describimos el efecto del Compuesto 1 sobre la viabilidad, proliferación, migración y progresión del ciclo celular de

células HT-29. Con el fin de identificar el blanco o dianas moleculares afectadas por el Compuesto 1, se realizó un análisis de secuenciación del transcriptoma (RNA sequencing).

Materiales y métodos

Síntesis del compuesto de prueba: el compuesto 8-hydroxy-2-(2-thenoyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compuesto 1) se preparó como se describió en la referencia^[7][168], obteniéndose con una pureza >95%. Para los experimentos, se prepararon soluciones stock del compuesto usando dimetilsulfóxido (DMSO; Fisher Scientific, USA) y se diluyeron en medio de cultivo completo y suplementado cuando fue necesario. El porcentaje final de DMSO se mantuvo hasta un máximo de 0.1% (v/v).

Cultivos celulares: HT-29 (línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano; Cat#HTB38TM; passages: 10–25), PCS-201-012 (fibroblastos primarios dérmicos; passages: 3–8), MRC-5 (fibroblastos pulmonares fetales humanos normales; Cat# CCL-171; passages: 5–15) y 3T3-L1 (fibroblastos embrionarios de *Mus musculus* Cat#CL-173; passages: 5–15) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células fueron mantenidas de manera rutinaria a 37°C y 5% CO₂, en medios de cultivo apropiados para su crecimiento: McCoy's 5A (HT-29), Dulbecco's Modified Eagle's medium (PCS-201-012 y 3T3-L1) o Eagle's Minimal Essential Medium (MRC-5) los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y fueron suplementados con suero fetal bovino al 10% (FBS; Gibco, Waltham, MA, USA o Sao Paulo, Brazil), bicarbonato de sodio al 1.5 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y low serum growth supplement (Invitrogen, Waltham, MA, USA) solo para el medio utilizado en el cultivo de PCS-201-012.

Ensayo anti-proliferativo: el efecto del Compuesto 1 sobre la viabilidad celular fue determinada usando el ensayo de reducción del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, siguiendo el procedimiento descrito en^[6][1]. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (1–1.5 × 10⁴ células/pozo) e incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 24 h. Posteriormente, las células se trataron con diferentes concentraciones del compuesto de prueba (0–40 µM), el cual se disolvió en medio de cultivo y se dejó actuar por 48 h. trascurrido este tiempo, el medio fue aspirado y reemplazado por una solución de MTT (0.25 mg/mL) y se incubó por 4 h. Luego, la solución fue removida cuidadosamente, los cristales de formazán fueron disueltos en DMSO (100 mL/pozo) y se midió la densidad óptica a 550 nm (OD_{550nm}) usando un lector de placas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los valores fueron presentados como el porcentaje de crecimiento relativo de células viables sobre células no tratadas (control 0 µM) y se expresaron como la media ± el error estándar de la media (EEM) de muestras sembradas por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

Ensayo de clonogenicidad: este ensayo se utilizó para evaluar la capacidad de replicación de células tratadas con el compuesto 1^[8][169]. Células HT-29 o MRC-5 (750 células/pozo) fueron sembradas en placas de 6 pozos e incubadas por 6 h para su adhesión y posteriormente tratadas por 48 h con vehículo (DMSO), Doxorubicina (1 µM) o Compuesto 1 (0.86 y 1.73

μM). Trascurrido este tiempo, el medio fue reemplazado por medio completo y suplementado y se dejaron formar las colonias por 7 días. Luego, las colonias fueron fijadas con ácido acético:metanol 1:7 v/v, teñidas con cristal violeta al 0.5% y contadas con un estereomicroscopio (EZ4 HD, Leica Microsystems, Singapore). Se realizaron un total de tres experimentos independientes con muestras sembradas por duplicado.

Ensayo de cicatrización (wound healing): la influencia del Compuesto 1 sobre la migración de células de CCR fue evaluada usando el ensayo de cicatrización. Las células HT-29 se sembraron en placas de 24 pozos (2×10^5 células/pozo) y se dejaron crecer hasta confluencia. Luego se realizó una separación homogénea en el centro de la monocapa utilizando para ello una punta de micropipeta estéril. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio libre de FBS y tratadas con vehículo (DMSO) o el Compuesto 1 (0.5 y 1 μM). El cultivo fue monitoreado cada 24 h por tres días usando un microscopio invertido (Nikon, Melville, NY, USA) equipado con una cámara digital con la que se capturaron imágenes que posteriormente se analizaron con TScratch software (<http://www.cse-lab.ethz.ch>)^[9][170]. Se llevaron a cabo un número total de tres experimentos independientes con muestras sembradas por duplicado.

Análisis del ciclo celular: para conocer el efecto del compuesto de prueba sobre la distribución del ciclo celular, células HT-29 fueron expuestas al vehículo (DMSO) o Compuesto 1 (0.86 y 1.73 μM) por 48 h y posteriormente se marcaron usando un kit de yoduro de propidio (ab139418; Abcam, Cambridge, UK) siguiendo las especificaciones del fabricante. La distribución del ciclo celular fue determinada haciendo lecturas en un citómetro de flujo (Dako, Beckman Coulter Inc., CA, USA). Se realizaron un total de tres experimentos independientes sembrando muestras por duplicado.

Extracción del RNA total y análisis: el RNA total de células HT-29 tratadas con Compuesto 1 (1.73 μM , 48 h) o vehículo fue extraído usando un kit comercial (GeneJET™; Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración, pureza e integridad del RNA aislado fue cuantificada por la Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia) usando un NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific), un Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y un Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las concentraciones estuvieron entre los 49.8 a 97.6 ng/ μL ; la relación 260/280 se mantuvo por encima de 1.9 y los valores numéricos de integridad del RNA estuvieron por encima de 7, a excepción de dos muestras.

Análisis de secuenciación de RNA (RNA-sequencing): la preparación de las bibliotecas y la secuenciación fue realizada por la empresa MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA). Las bibliotecas se prepararon con el RNA total (150–500 ng) usando el TruSeq™ RNA LT Sample Preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) y se validaron usando un Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) y el Agilent 2100 Bioanalyzer system, como se muestra en la **Tabla 2**. Las bibliotecas se agruparon a concentraciones equimolares (2 nM) y 5 pM de este grupo (pool) fue normalizado y concentrado usando el cBOT (Illumina

Inc.). La secuenciación fue realizada utilizando una configuración de 2×150 bp paired-end en un HiSeq 2500 plataforma por 300 ciclos (Illumina Inc.).

Análisis bioinformático: el análisis bioinformático inicial fue realizado por la Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia). Para realizar el control de calidad de las secuencias sin procesar se utilizó FastQC. Se empleó Trimmomatic^[10][171] para remover secuencias adaptadoras, recortar extremos de baja calidad (*low-quality ends*) y filtrar lecturas de baja calidad (*low-quality reads*) a un puntaje de calidad *phred* de Q33. Para la limpieza de lecturas de alta calidad (*clean high-quality reads*) estas se alinearon con un genoma humano de referencia (GRCh38.p7) utilizando Tophat^[11][172]. El nivel de expresión para cada transcripto fue calculado como fragmentos por kilobase del transcripto por millón de fragmentos mapeados (FPKM) usando Cufflinks. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron identificados con Cuffdiff^[12][173], considerándose el siguiente umbral (threshold): $\log_2 |(\text{fold change})| \geq 0.5$, $p\text{-value} \leq 0.001$ y tasa de descubrimiento erróneo (*false discovery rate-FDR*) $q\text{-value} \leq 0.05$. Para identificar las vías impactadas, procesos biológicos y funciones moleculares, etc., afectadas de manera significativa se utilizó el software en línea iPathwayGuide (Advaita Corporation, Plymouth, MI, USA).

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR): se cuantificaron los niveles de transcripción de 6 DEGs (SPRR1B, HSPA6, SPRR3, IFITM1, IFI44L y OAS2) para validar el análisis RNA-sequencing. Para ello, 1.0 µg of RNA fue empleado para sintetizar cDNA usando el High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). Para el RT-qPCR se utilizó el LightCycler® 96 System (Roche, Mannheim, Germany) empleando FastStart Essential DNA Green Master (Roche) y primers específicos (**Tabla 1**; Eurofins Genomics, Huntsville, USA). La expresión de genes fue normalizada usando como genes de referencia glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) o hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1). Los valores de umbral de ciclo duplicado (*duplicate cycle threshold-CT*) fueron analizados por el método comparativo de CT ($\Delta\Delta CT$).

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para el análisis de RT-qPCR

Gene symbol	Gene ID	Official name	Primer sequences ^a	T _m ^b	Amplicon Size (pb)
GAPDH	2597	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: TCGACAGTCAGCCGCATCTCTTT R: AACTCTACTTTGCAGAACCTCAC	64.6°C 64.6°C	94
HPRT	3251	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	F: ACCAGTCAACAGGGGACATAA R: CTTCTGTTGGGTCCTTTTACC	58.7°C 61.2°C	190
HSPA6	3310	Heat shock protein family A (Hsp70) member 6	F: CATCGCCTATGGGCTGGAC R: GGAGAGAACCGACACATCGAA	59.8°C 58.5°C	94
IFI44L	10964	IFN induced protein 44 like	F: ACAGAGCCAAATGATCCCTATG R: TCGATAAACGACACACAGTTG	58.6°C 58.9°C	124
IFITM1	8519	IFN induced transmembrane protein 1	F: ACTCAACACTTCTTCCCAA R: CTTCTGTCCCTAGACTTCACG	59.2°C 59.8°C	231
OAS2	4939	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	F: AGGTGGCTCCTATGGACGG R: TTTATCGAGGATGTCACGTTGG	60.8°C 58.5°C	124
SPRR1B	6699	Small proline-rich protein 1B	F: TATTCCTCTTTCACACGAG R: TCCTTGGTTTTGGGGATG	53.8°C 54.3°C	155
SPRR3	6707	Small proline-rich protein 3	F: CATGAGTTCTTACCAGCAGAAGCAG R: TTCCAGGTTGTGGAACCTTTGAG	61.9°C 60.9°C	149

^aF: Forward (5' → 3'); R: Reverse (5' → 3'). ^bT_m: melting temperature.

Análisis estadístico: los datos se presentaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) fue calculada usando regresión no lineal (*non-linear regression*). Los datos fueron analizados por one-way analysis of variance (ANOVA) seguido por Holm-Sidak's multiple comparisons test. La significancia estadística fue considerada a $P < 0.05$.

Tabla 2. Resumen de datos del análisis de RNA-seq (incluye la construcción de la biblioteca, secuenciado y resultados del mapeo)

Treatment	Sample	Library size (average)	Raw reads	Clean reads	Mapped reads	Mapping rate (%)	GC%
Vehicle (DMSO)	1	588	12.526.531	11.931.359	10.537.310	88.3	51
	2	696	14.816.823	14.044.340	12.334.470	87.8	51
	3	680	14.596.730	13.858.108	12.218.747	88.2	51
Compound 1	4	476	9.689.734	9.216.012	8.030.070	87.1	51
	5	568	12.508.590	11.895.159	10.410.417	87.5	50
	6	616	10.433.154	9.782.330	8.609.506	88.0	50

GC%: guanine-cytosine percentage.

Resultados

El Compuesto 1 mostró actividad inhibitoria *in vitro* específica sobre CRC: como recientemente reportó^[7][168], el compuesto 8-hydroxy-2-(2-thenoyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compuesto 1), ejerció un efecto citotóxico selectivo frente a células de CCR (HT-29; IC₅₀=1.73 \pm 0.08 μ M) en comparación con fibroblastos dérmicos (PCS-201-012; IC₅₀=4.59 \pm 0.48 μ M). La selectividad del Compuesto 1 fue confirmada usando fibroblastos humanos (MRC-5; IC₅₀=6.97 \pm 0.66 μ M; **Figura 1a**) y murinos (3T3-L1; IC₅₀=14.32 \pm 2.14 μ M). Además, tanto a concentraciones citotóxicas como no citotóxicas (1.73 y 0.86 μ M) el Compuesto 1 inhibió la capacidad formadora de colonias de las células HT-29 mientras que a esas mismas concentraciones los fibroblastos no sufrieron cambios aparentes (**Figura 1b**). Adicionalmente, el test de Ames reveló que el Compuesto 1 no induce cambios mutagénicos incluso a altas concentraciones (4.8 y 9.6 μ M, datos no mostrados). Tomando como base estos datos, la IC₅₀ (1.73 μ M) fue seleccionada como concentración efectiva del Compuesto 1 para la realización de los ensayos posteriores. Para evaluar la inhibición de la capacidad migratoria de células HT-29, se realizó un ensayo de cicatrización (*wound-healing*) usando una monocapa de células HT-29 que creció hasta confluencia y luego se separó en partes iguales usando una punta de micropipeta. Como se muestra en **Figura 1c**, la velocidad de recuperación del área para la unión de la monocapa fue disminuida significativamente por el tratamiento con el Compuesto 1 (0.5 y 1 μ M) de manera concentración-dependiente y a tiempos de exposición de 48 y 72 horas.

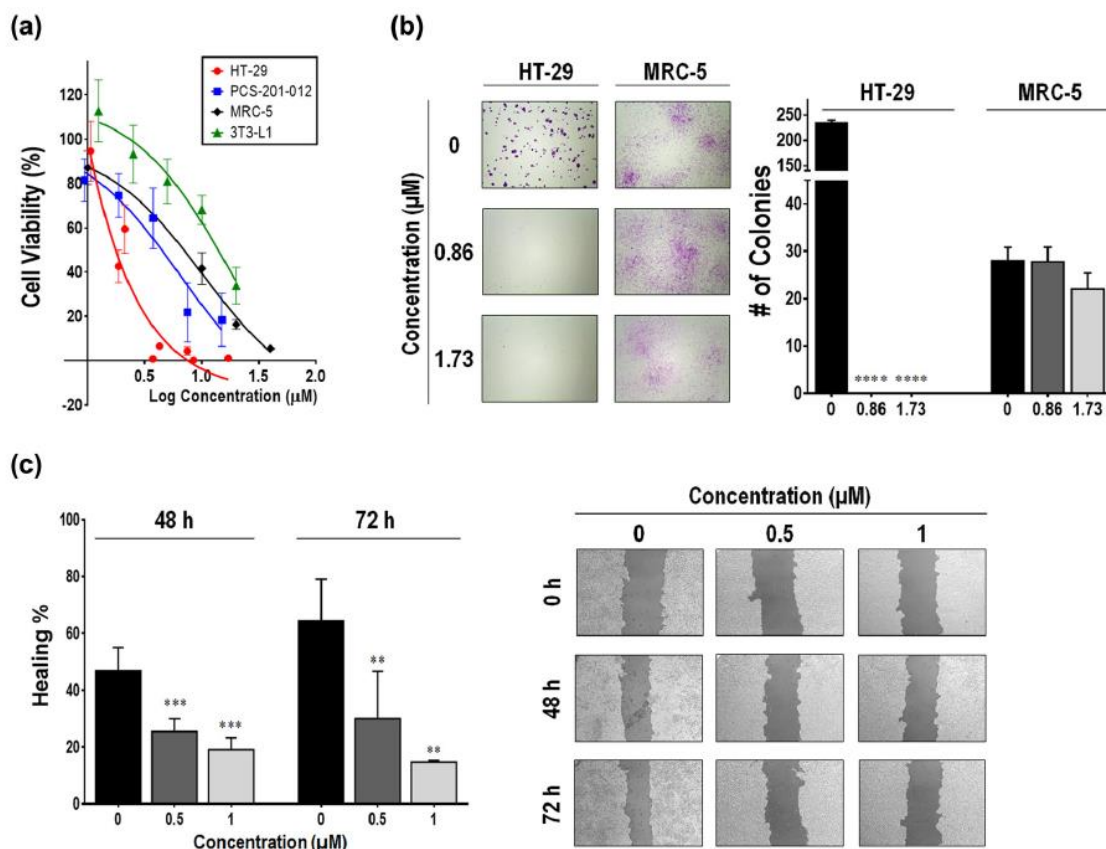


Figura 1. El tratamiento con 8-hydroxy-2-(2-thenoyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (**Compuesto 1**) mostró un efecto inhibitorio específico sobre la migración y la proliferación. (a) Viabilidad celular de células de CRC (HT-29) versus la viabilidad de fibroblastos (PCS-201-012 y MRC-5), determinada utilizando el ensayo de MTT cuando se trataron con el Compuesto 1. (b) El ensayo de formación de colonias confirmó la selectividad del Compuesto 1 sobre las células de CRC. Se muestran imágenes representativas de las colonias obtenidas con un estereomicroscopio a 8x. (c) Cambios en la migración celular inducidos por el Compuesto 1. La superficie cubierta por células migratorias fue monitoreada cada 24 h usando un microscopio. Se muestran imágenes representativas a 10x. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) de muestras sembradas en duplicado o triplicado en experimentos independientes (n=6-12). Las diferencias significativas con respecto al control se indicaron para valores de $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

El efecto anti-proliferativo del compuesto 1 se da por inducción de arresto en la progresión del ciclo celular: la citometría de flujo fue utilizada para determinar si los cambios en la distribución del ciclo celular estaban involucrados en la reducción de la viabilidad de las células HT-29 cuando son expuestas al Compuesto 1. La **Figura 2** muestra que el tratamiento con el Compuesto 1 (1.73 μM) produjo un incremento significativo de la proporción de células en fase G2/M (2N-4N), desde $15.15 \pm 4.62\%$ (control - 0 μM) a $29.30 \pm 6.86\%$, indicando que este compuesto inhibe la proliferación de células de CCR a través de inducción de arresto celular en fase G2/M.

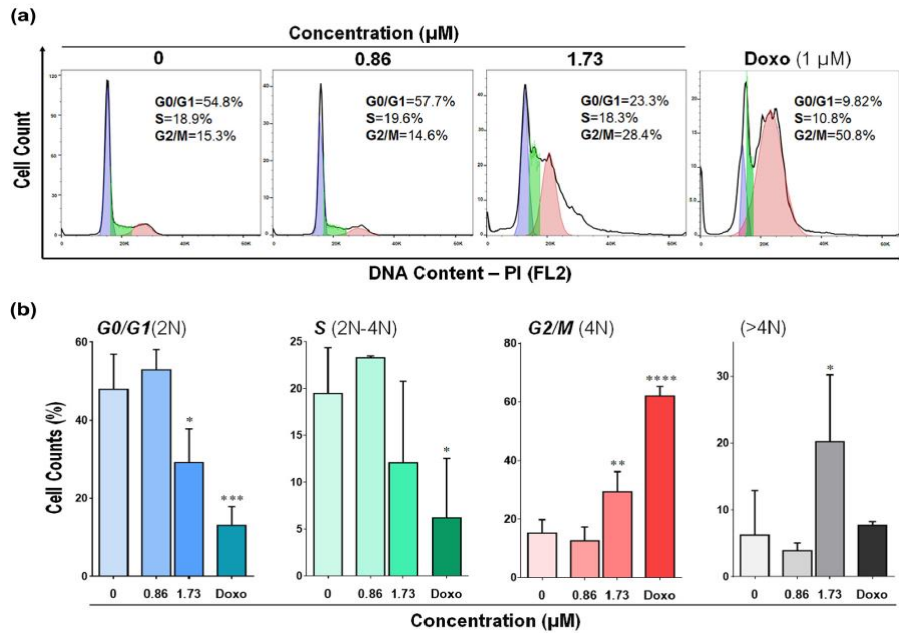


Figura 2. El Compuesto 1 inhibió la proliferación de células HT-29 por inducción de arresto en fase G2/M. La distribución del ciclo celular fue determinada a través de tinción con PI y citometría de flujo. (a) El histograma muestra el número de células (eje vertical) vs el contenido de DNA-PI (eje horizontal-canal FL2). (b) Porcentaje de células indicado para cada fase del ciclo celular de acuerdo a los datos mostrados en (a). Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar de la media (EEM) de muestras sembradas en duplicado en tres experimentos independientes (n=6). Las diferencias significativas con respecto al control se indicaron para valores de $**p < 0.05$; $*p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

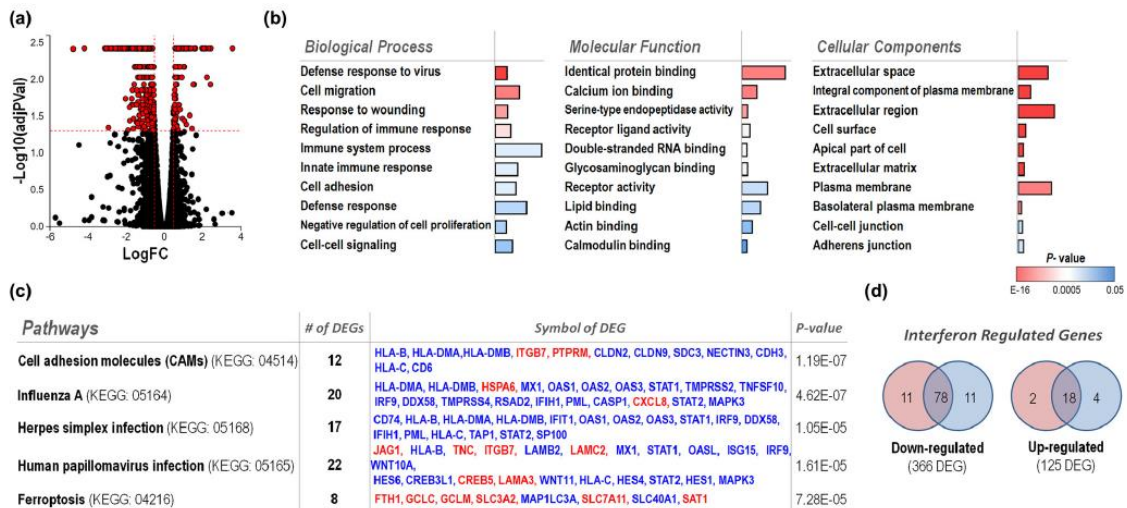


Figura 3. El Compuesto 1 causó cambios transcriptómicos distintivos en células HT-29 mostrando efecto significativo en genes asociados a la proliferación celular y supervivencia, respuesta a virus y ferroptosis. (a) Los cambios en la expresión de mRNA de HT-29 tratadas con el Compuesto 1 (1.73 μM) en comparación con el control se presentan usando un Volcano plot construido usando iPathwayGuide. Los valores positivos en el eje x indican regulación al alta (*up-regulation*), mientras que los valores negativos indican regulación a la baja (*down-regulation*), ambos se presentan como \log_2 fold change ($\log_2(\text{FC})$). El eje y representa en escala logarítmica los valores de p-ajustados. Los puntos rojos (491) representan los genes diferencialmente expresados (DEGs). (b) El análisis GO fue desarrollado con iPathwayGuide; Cut-off p-value, $p < 0.05$, usando

una corrección de peso. El enriquecimiento significativo se muestra como una barra de color intenso mientras que su altura es proporcional al número de DEGs en los términos GO. (c) Las cinco vías más impactadas por el tratamiento con el Compuesto 1 categorizadas según el iPathwayGuide con p-values sin corregir. Los DEGs que se resaltan en rojo son los que se encuentran regulados al alta (*up-regulated*) y los resaltados en azul son aquellos regulados a la baja (*down-regulated*). (d) La base de datos Interferome fue empleada para identificar los IRGs-tipo I (rojo) y tipo II (azul) en la lista de DEGs.

La secuenciación del transcriptoma reveló que el Compuesto 1 redujo las señales carcinogénicas de células HT-29 e indujo la muerte celular a través de ferroptosis e inhibición de la vía de señalización de la MAPK: para determinar como el Compuesto 1 inhibió la viabilidad de células CCR, se realizó un análisis RNA-sequencing (RNA-seq) comparativo usando células HT-29 tratadas con vehículo (control) o Compuesto 1 (1.73 μ M). Como se muestra en **Tabla 2**, las lecturas, la velocidad de mapeo y el contenido de GC (guanina-citosina) fueron similares en todas las muestras analizadas. Después de filtrar los transcritos diferencialmente expresados ($p < 0.05$ y (FDR)- q value < 0.05), se identificó un total de 491 genes que diferían significativamente en las células HT-29 tratadas con Compuesto 1 en comparación con las de control (**Figura 3a**). El Compuesto 1 redujo la expresión de 366 genes e incrementó la de 125 genes. El análisis transcriptómico fue validado por la correlación significativa entre los datos obtenidos en el RNA-seq y RT-qPCR [*least-squares linear regression*, $p < 0.05$; $R^2 = 0.911$ (GAPDH) y $R^2 = 0.908$ (HPRT)] al estudiar un subset seleccionado de genes diferencialmente expresados (DEGs). El análisis de ontología génica (GO) fue desarrollado usando iPathwayGuide online software sobre todos los DEGs. La **Figura 3b** muestra mediante un gráfico de barras los p-values obtenidos del análisis, la lista de los 10 principales términos (top-10) GO relacionados con procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. De acuerdo a los resultados, el Compuesto 1 indujo un enriquecimiento significativo de los términos relacionados con la progresión del cáncer (por ejemplo, proliferación y migración celular, angiogénesis, comunicación y unión entre células, respuesta a estrés oxidativo y respuesta inmune). El análisis de impacto reveló las vías más influenciadas (**Figura 3c**), destacándose el enriquecimiento significativo de moléculas de adhesión celular (KEGG: 04514) y ferroptosis (KEGG: 04216), las cuales están vinculadas a interacciones celulares (respuesta inmune, reconocimiento antigénico y adhesión celular) y regulación de la muerte celular. En particular, el tratamiento con el Compuesto 1 resultó en una asociación significativa con términos (por ejemplo, respuesta de defensa a virus) y vías (por ejemplo, influenza A, infección por herpes simple, infección por papilomavirus humano) asociadas con la respuesta inmune anti-viral lo cual es una consecuencia de la marcada reducción de genes regulados por interferón (IRGs). En efecto, Interferome database^[13][174] predijo que el 28% de los genes regulados a la baja (*down-regulated* DEGs) están regulados por interferón del tipo I o II (**Figura 3d**). Además, 8 de los genes del top-10 regulados a la baja (*down-regulated*) fueron identificados como IRGs (IFITM1, IFI44L, XAF1, EPSTI1, MX2, RSAD2 y CMPK2). De manera interesante, muchos estudios reportan que estos IRGs están sobreexpresados en líneas celulares obtenidas a partir de biopsias de tejidos extraídas de pacientes con CCR y su regulación al alta (*up-regulation*) está asociada con la resistencia a la quimioterapia (**Tabla 3**). Paralelamente, el análisis de los genes del 10-top regulados al alta (*up-regulated*) mostró su asociación con el

desarrollo epidermal (SPRR1B, SPRR3, SPRR1A, y SCEL), biosíntesis del ácido retinoico (DHRS9) y el estrés celular extremo (HSPA6). Conjuntamente, el Compuesto 1 indujo la expresión de un gen supresor de tumores (AKAP12), un inhibidor de cisteína proteasa (CST1) y leucine-rich repeat neuronal 4 (LRRN4) (**Tabla 4**). Teniendo en cuenta que la ferroptosis, un tipo de muerte celular no apoptótica dependiente de hierro, fue una de las más impactadas por el tratamiento con el Compuesto 1, se realizó un análisis detallado de los genes regulados. Como resultado se encontró que el Compuesto 1 aumentó significativamente la expresión de genes involucrados con el transportador glutamato/cisteína (SLC3A2 y SLC7A11) y con el depósito del hierro (FTH1-ferritin), el cual está regulado a la baja (*down-regulated*) en células de CCR o de adenoma con displasia^[14-17][150,175-177]. Alternativamente, el Compuesto 1 redujo la expresión de genes involucrados en el eflujo de hierro (SLC40A1-Ferroportin-1) y degradación de ferritina (LC3), los cuales están sobre expresados en CCR^[17,18][177,178]

Discusión

Compuestos novedosos efectivos que poseen como diana biológica específica a células tumorales son importantes para el desarrollo de tratamientos promisorios. Moléculas creadas a partir de compuestos obtenidos de recursos naturales como los derivados de naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-diones, han sido propuestos como estructuras transcendentales que poseen diversos estudios y patentes otorgadas por su potente efecto anti-cáncer^[19,20][179,180]. En este trabajo, nos enfocamos en el estudio del compuesto 8-hydroxy-2-(2-thenoyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compuesto 1), el cual en un estudio realizado previamente realizado por nosotros fue identificado como una molécula con alta capacidad anti-proliferativa sobre líneas celulares (HaCaT $IC_{50}=0.29 \mu M$; HT-29 $IC_{50}=1.78 \mu M$ ^[6,7][1,168]. En este trabajo, encontramos que el tratamiento con el Compuesto 1 mostró una citotoxicidad selectiva frente a células de cáncer colorrectal HT-29, mientras que afectó en menor proporción la viabilidad de fibroblastos humanos y murinos de diferentes fuentes (piel, pulmón y embrionarios). Nuestros resultados muestran que el Compuesto 1 tiene un mayor impacto sobre la proliferación y migración de células HT-29, evidencia de ello fue la ausencia de la formación de colonias (ensayo de clonogenicidad) y la poca reducción del área de separación de la monocapa en el ensayo de cicatrización (wound-healing) realizados a concentraciones tóxicas y no tóxicas del compuesto. Adicionalmente, este derivado nafto tiofeno quinónico desencadena arresto en la fase G2/M del ciclo celular soportado por los resultados obtenidos en el análisis de citometría de flujo. Hasta la fecha, se acepta que compuestos basados en el núcleo naftoquinónico ejercen su efecto citotóxico induciendo estrés oxidativo por ciclado redox de la quinona a través de la reducción de un electrón por NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase (CPR), lo que origina el radical semiquinona que a continuación sufrirá la reducción de dos electrones por la NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) originándose la hidroquinona^[19][179]. Por lo tanto, la mayoría de los estudios farmacológicos de las NQs se enfocan en la determinación de los niveles de superóxido y de especies reactivas de oxígeno (EROs), sin embargo, el mecanismo molecular exacto sigue siendo desconocido. Para el caso del Compuesto 1, Bannwitz *et al.* reportó que

su efecto anti-proliferativo está asociado con el bajo daño que provoca en la membrana^[7][168]. Además, en ese mismo estudio se mencionó que varios compuestos del tipo naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-diones son activados por la CPR o NQO-1; por lo que su capacidad para inducir muerte celular esta poco relacionada con la cantidad de superóxido, lo que indica que están involucrados otros mecanismos en esta acción biológica. En nuestro trabajo, identificamos alteraciones transcriptómicas inducidas por el Compuesto 1 en la línea celular de CRC HT-29 utilizando RNA-seq validado con RT-qPCR. El análisis transcriptómico mostró que el Compuesto 1 promueve la expresión diferencial de genes cruciales involucrados en la supervivencia, migración, señalización y comunicación celular, así como en la respuesta inmune y a estrés oxidativo, entre otros. El análisis detallado del top 10 DEGs, tanto de los genes regulados a la baja como al alta (*up- or down-regulated* - **Tablas 3 y 4**) permitió verificar que el Compuesto 1 redujo las señales carcinogénicas de células HT-29, identificándose al menos que el 50% de DEGs se alteraron en dirección opuesta a lo que sucede en el CCR. Esta observación fue particularmente importante en el caso de IRGs, los cuales estaban regulados significativamente a la baja (*down-regulated*) en células tratadas con el Compuesto 1. Aunque la vía de señalización del interferón (IFN) esta tradicionalmente conectada con funciones pro-apoptóticas supresoras de tumores, datos recientes han demostrado que, en ciertos contextos, la vía IFN activada podría mediar crecimiento celular, metástasis y resistencia a ciertas terapias^[21][181]. En el caso del cáncer colorrectal, se ha descrito que una característica de las células resistentes al irinotecán es la expresión al alta (*up-regulated*) de IRGs (por ejemplo, IFIT1, G1P3, IFI35, IFITM1, OAS1, y IFIT3)^[22][182].

El análisis de impacto de las vías alteradas complementó sustancialmente la información relacionada con los mecanismos moleculares de acción citotóxica del Compuesto 1. En este análisis se evidenció que este derivado afectó varias vías que promueven la muerte celular (ferroptosis), la proliferación y supervivencia celular (MAPK y PI3K-AKT). La ferroptosis es un tipo de muerte celular regulada por la acumulación de peróxidos lipídicos dependientes de hierro que se generan durante la producción excesiva de EROs^[23][204], la cual es desencadenada por (a) inhibidores de cystine/glutamate antiporter (sistema Xc⁻ SLC3A2/SLC7A11) que reduce la síntesis y contenido de glutatión causando daño oxidativo; o (b) inhibidores de glutathione peroxidase 4 (GPx4) lo que conduce a una peroxidación lipídica incontrolada^[23][204]. De acuerdo a nuestro análisis transcriptómico, el Compuesto 1 induce la muerte oxidativa causando los siguientes eventos: (1) acumulación del contenido de hierro intracelular por aumento de ferritina (FTH1), disminución de ferroportin-1 (SLC40A1) y expresión de LC3 (MAP1LC3A); (2) aumento de EROs (ciclado redox) acompañado de agotamiento del glutatión intracelular, lo que a su vez conduce a la regulación a la alta (*up-regulation*) de glutamate cysteine ligase (GLC); o (3) disminución de la función del Xc⁻ transport, ya sea por bloqueo directo o indirecto, lo cual se esperaría que disminuya los niveles de glutatión, induciendo la expresión de SLC7A11 y SLC3A2 (**Figura 4**).

Tabla 3. Top-10 de los genes diferencialmente expresados a la baja (*down-regulated*)

Gene symbol	Description	Function	Association with CRC	LogFC	q value	Ref.
IFITM1	IFN-induced transmembrane protein 1	IFN-induced antiviral protein. Plays a key role in the antiproliferative action of IFN- γ (inhibition of ERK activation or arresting cell growth in G1-phase trough p53)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Expression in CRC tissue that is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis ↑ Proliferation and invasiveness of SW480 and DLD-1 cells with stable/ectopic over-expression of IFITM1 ↓ Migration/invasion ability of CRC cells (HT-29, LoVo, and DLD-1) with transient/stable knockdown of IFITM1 	-4.769	0.004	[36,37]
IF44L	IFN-induced protein 44-like	Exhibits a low antiviral activity against hepatitis C virus	↑ Expression in HT-29 cells resistant to oxaliplatin	-4.196	0.004	[38]
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthase 2	IFN-induced, dsRNA-activated antiviral enzyme	↓ mRNA expression in high pro-migratory profile cancer-associated fibroblasts from CRC patients	-3.127	0.004	[39]
XAF1	XIAP-associated factor 1	Seems to function as a negative regulator of members of the IAP (inhibitor of apoptosis protein) family	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Expression in several cell lines and CRC tissue, which is associated with advance stage and high grade of tumor The restoration of XAF1 expression in CRC cells induces apoptosis and enhanced chemotherapy sensitivity 	-3.059	0.004	[40,41]
EPST1	Epithelial-stromal interaction protein 1	—	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Expression in sporadic and IBD-associated CRC cell lines with knockdown expression of Nkx2-3, a transcription factor down-regulated in CRC ↓ Expression in CRC cells with strong EMT phenotype 	-3.046	0.004	[42,43]
MX2	IFN-induced GTP-binding protein Mx2	IFN-induced dynamin-like GTPase with potent antiviral activity	—	-2.979	0.004	—
RSAD2	IFN-inducible iron-sulfur (4FE-4S) cluster-binding antiviral protein	IFN-inducible iron-sulfur (4FE-4S) cluster-binding antiviral protein	↑ Expression in CRC samples when compared with colorectal adenomas	-2.934	0.004	[44]
PAX4	Paired box protein Pax-4	Plays an important role in the differentiation and development of pancreatic islet beta cells	↑ mRNA levels in HCT116 cells with induced invasiveness and migration	-2.927	0.045	[45]
FFAR2	Free fatty acid receptor 2	G protein-coupled receptor that is activated by the short-chain fatty acids (SCFAs)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mRNA and protein expression in CRC specimens ↓ mRNA and protein levels in human CRC tissue Far2^{-/-} mice are more susceptible to AOM-DSS ↑ mRNA expression of FFAR2 is detected only in HT-29 cells out of 8 CRC cell lines ↓ mRNA expression is associated with a lower CRC risk score 	-2.824	0.004	[46,47]
CMPK2	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial	May participate in dUTP and dCTP synthesis in mitochondria	—	-2.792	0.004	[48]

LogFC: Log2 fold change.

Referencias bibliográficas de la tabla: ^[36-37][131,132], ^[38][183], ^[39][184], ^[40, 41][185,186], ^[42, 43][187,188], ^[44][189], ^[45][190], ^[46, 47][191,192], ^[48][128].

Tabla 4. Top-10 de los genes diferencialmente expresados al alta (*up-regulated*)

Gene Symbol	Description	Function	Association with CRC	LogFC	q value	Ref.
SPRR1B	Cornifin-B	Cross-linked envelope protein of keratinocytes	—	3.541	0.004	—
HSPA6	Heat shock 70 kDa protein 6	Molecular chaperone implicated in a wide variety of cellular processes	↑ Expression when cell death was induced by electrohyperthermia using HT-29 CRC xenografts	2.463	0.004	[30]
SPRR3	Small proline-rich protein 3	Cross-linked envelope protein of keratinocytes	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Expression is involved in colorectal tumorigenesis, CRC proliferation, and lymphovascular invasion ↑ Expression in CRC tissue and cell lines (i.e., HT-29) ↓ mRNA expression or methylation of gene promoter in CRC tissue 	2.438	0.012	[49,50]
AKAP12	A-kinase anchor protein 12	Anchoring protein that mediates the subcellular compartmentation of protein kinase A and C. (Tumor suppressor gene)	<ul style="list-style-type: none"> — Represents a potential molecular biomarker for predicting CRC malignancy — The re-expression of AKAP12 induced apoptosis, reduced colony formation and migration of LoVo cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> 	2.335	0.004	[51,52]
SPRR1A	Cornifin-A	Cross-linked envelope protein of keratinocytes	<ul style="list-style-type: none"> ↓ mRNA expression in a mouse model of CRC ↑ Expression and ↓ methylation in CRC tissue 	2.248	0.009	[53]
SCEL	Sciellin	May function in the assembly or regulation of proteins in the cornified envelope	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Expression in metastatic cell lines promoted CRC cell migration and invasion (↑Vimentin; ↓E-cadherin), while overexpression had the opposite effect (MET inducer?) ↑ Expression in CRC specimens with higher clinical stage and hepatic metastasis 	2.171	0.004	[54]
DHRS9	Dehydrogenase/reductase SDR family member 9	3-Alpha-hydroxysteroid dehydrogenase that participates in dihydroxyprogesterone and retinoic acid biosynthesis	<ul style="list-style-type: none"> ↓ mRNA and protein expression in CRC clinical samples. It might represent a useful biomarker of prognosis 	2.163	0.004	[55]
LRRN4	Leucine-rich repeat neuronal protein 4	May play an important role in hippocampus-dependent long-lasting memory	Identified as a low abundance protein in CRC tissues	2.009	0.004	[56]
AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1	Converts progesterone to its inactive form. In the liver and intestine may have a role in the transport of bile	↓ mRNA expression at the tumor center when compared to normal mucosa	1.659	0.004	[57]
CST1	Cystatin-SN	Cysteine proteinase inhibitors	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mRNA levels in CRC cell lines (Caco-2 and SW480) and affected tissue from patients ↑ Levels in urine from CRC patients 	1.611	0.004	[58]

LogFC: Log2 fold change.

Referencias bibliográficas de la tabla: ^[30][193], ^[49, 50][194,195], ^[51, 52][196,197], ^[53][198], ^[54][199], ^[55][200], ^[56][201], ^[57][202], ^[58][203].

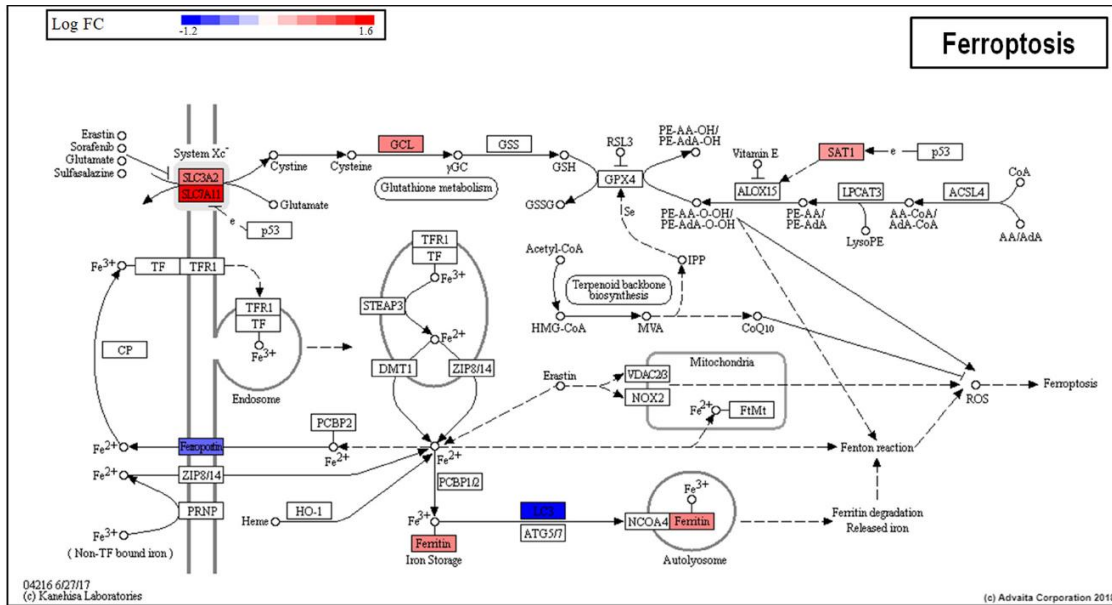


Figura 4. El Compuesto 1 impactó significativamente la expresión de dianas dentro de la vía de la ferroptosis. Se utilizó iPathwayGuide online software para desarrollar el análisis de impacto. (a) La diferencia en la expresión de mRNA de células HT-29 tratadas con el Compuesto 1 (1.73 μ M) o vehículo (control) se muestra con el mapa de calor construido con el Log₂ fold change (LogFC) ubicado en la parte superior izquierda de la figura. El color azul indica genes regulados a la baja (*down-regulated*) y el color rojo indica genes regulados al alta (*up-regulated*) ($\log_2(\text{fold change}) \geq 0.5$, $p\text{-value} \leq 0.001$ y $q\text{-value} \leq 0.05$).

Adicionalmente, el Compuesto 1 reguló también la expresión de diversas proteínas de choque térmico (HSPs), involucradas en las vías de señalización que afectan el metabolismo del hierro y la ferroptosis. Específicamente, el tratamiento con el Compuesto 1, redujo la expresión de HSPB1 (conocida también como HSP-27), cuyos niveles están a menudo elevados y asociados con resistencia a la quimioterapia y a pésimos pronósticos clínicos en CCR^[24][205]. De manera interesante, el efecto protector contra el estrés oxidativo por reducción de la captación de hierro ha sido relacionado con HSPB1^[23][204] también se ha observado con otros compuestos inductores de ferroptosis como la erastina; cuyo tratamiento ocasionó inhibición de esta proteína, induciendo la acumulación de hierro intracelular ocasionando peroxidación lipídica y daño en las células de cáncer, mientras que la sobreexpresión de HSPB1 inhibió todos los eventos anteriormente descritos^[25][157]. Alternativamente, el Compuesto 1 reguló al alta (*up-regulated*) la expresión de HSPA6 (HSP70B) y HSPH1 (HSP110 o HSP105), chaperonas moleculares que son conocidas por mejorar la supervivencia celular durante estrés extremo. Aunque la alta expresión de HSP no se considera favorable para pacientes con CCR^[26][206]; se ha demostrado que tratamientos citotóxicos que aumentan la expresión de HSPH1 y HSPA6 puede favorecer el reconocimiento inmune de tumores^[27,28][207,208] o inhibir la proliferación, la migración e invasión de otros tejidos por parte de células de cáncer^[29,30][193,209].

Otra vía impactada significativamente por el Compuesto 1 fue la del mitogen-activated protein kinase (MAPK), las cuales incluyen a las quinasas ERK, p38, y c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), reconocidas por el control de la respuesta celular al ambiente, regulando el ciclo celular, la diferenciación, crecimiento y senescencia, funciones que son críticas en el proceso de iniciación y progresión del cáncer^[31][210]. Un conjunto de estudios ha demostrado que los derivados naftoquinónicos modulan la vía de las MAPKs; sin embargo, estos estudios son controversiales, ya que algunos muestran que la muerte celular es inducida por activación de ERK, p38 o JNK^[32,33][211,212], mientras que otros demuestran lo opuesto^[34][213]; indicando que la regulación de las MAPKs es dependiente de la estructura del compuesto o del contexto celular. En células HT-29, encontramos que el Compuesto 1 redujo significativamente la expresión de ERK, lo que podría explicar la inhibición de la proliferación y de la migración de esta línea previamente tratada. Adicionalmente, el análisis de perturbación indicó que la activación de JNK y p38 también se vio afectada por el Compuesto 1, lo que podría mejorar su efecto citotóxico. El compuesto de prueba, también mostró impactar significativamente la vía de señalización PI3K-AKT, esto es consecuente con lo descrito anteriormente ya que las vías Ras/Raf/MEK/ERK comparten blancos moleculares, tal como lo muestra el análisis de perturbación. Curiosamente, un estudio reciente señaló que el tratamiento de células cancerígenas con derivados naftoquinónicos tiolados produce una inhibición común de las vías ERK, AKT y STAT3^[35][214]. Como aporte adicional, nuestros resultados experimentales pusieron de manifiesto el valor del secuenciado transcriptómico como una herramienta para descubrir blancos moleculares fundamentales para el efecto anti-proliferativo de derivados naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-diones, mostrando además que uno de estos compuestos, el 8-hydroxy-2-(2-thenoyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compuesto 1) induce ferroptosis e inhibición de las vías de señalización de las MAPKs e PI3K-AKT evidentemente involucradas en su citotoxicidad. Sin embargo, deben realizarse estudios que involucren directamente los blancos moleculares identificados (por ejemplo, ensayo de MTT en presencia de inhibidores de ferroptosis o Western blot para detectar fosforilación de ERK), con el fin de determinar el mecanismo de acción exacto a través del cual el Compuesto 1 induce muerte e interconectar y correlacionar el estrés oxidativo, la ferroptosis y la activación de MAPK(ERK)/PI3K-AKT.

En conclusión, este estudio demostró que el tratamiento con el Compuesto 1 inhibió selectivamente la viabilidad, proliferación y migración de la línea de CCR HT-29 a través de inducción de arresto en el ciclo celular, ferroptosis e inhibición de la vía de MAPK, afectando específicamente la activación de ERK con consecuente perturbación de blancos moleculares comunes también afectados por la vía PI3K-AKT. La identificación de las dianas moleculares afectadas se determinó a través de RNA-seq, hecho que confirmó la utilidad del análisis transcriptómico para estudiar compuestos con estructuras base del tipo naftoquinónico e identificar blancos terapéuticos novedosos. De hecho, este estudio es el primer reporte de inducción de ferroptosis, un tipo de muerte celular oxidativa, por compuestos de este tipo; sugiriendo que su objetivo en el estrés oxidativo podría estar relacionado con la reprogramación del metabolismo del hierro como un mecanismo interesante para la terapia contra el CCR. Son necesarios estudios adicionales que permitan elucidar el vínculo entre

estrés oxidativo-ferroptosis-MAPKs y la muerte celular producida por el compuesto, así como también, su eficacia en modelos *in vivo* de actividad.

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos y fuentes de financiación: este trabajo fue financiado por MinCiencias y la Universidad de Cartagena (Contrato 474-2012, 597-2012 y 647-2014). Los autores agradecen a Julio Acuña y al Instituto de Investigaciones Inmunológicas por el soporte técnico en la citometría de flujo.

Contribuciones de los autores: LF concibió; el estudio LF y YO diseñaron y supervisaron los experimentos; KM sintetizó el compuesto **1**; DC, DR, y YO desarrollaron los experimentos; YO y LF escribieron manuscrito. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del manuscrito final.

DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIÓN

En los últimos años, es notable el incremento del consumo de preparaciones farmacéuticas que poseen como materia prima productos naturales. Un gran número de ellos contienen ingredientes activos provenientes de especies vegetales, las cuales históricamente, nos han proporcionado, además de alimento, sustancias que mitigan y curan los diferentes signos y síntomas que se presentan en una enfermedad. Su modo de empleo va desde preparaciones obtenidas de sus diferentes órganos hasta el uso de compuestos y principios activos aislados a través de diferentes procesos. Este potencial terapéutico de las plantas es explorado en gran medida en las zonas rurales en donde la asequibilidad al medicamento es limitada, hecho que contrasta con la abundancia de especies vegetales que crecen en esas zonas del mundo. Colombia, país mundialmente reconocido por su gran biodiversidad posee una gran flora inexplorada que podría constituirse en un importante punto de partida para encontrar nuevas y complejas estructuras químicas en sus plantas, las cuales pueden ser usadas directamente sin ninguna modificación o utilizarse como compuestos líderes o cabezas de serie cuya modificación estructural contribuiría a la obtención de nuevas entidades químicas que ayuden a enriquecer el arsenal terapéutico disponible para tratar el cáncer y, de esta manera aportar a la solución de la problemática que se presenta al utilizar los fármacos anticancerígenos tradicionales ya conocidos. En nuestro grupo de investigación, Evaluación Biológica de Sustancias Promisorias, se han desarrollado diferentes proyectos orientados hacia la exploración etnofarmacológica de nuestra flora, alcanzándose resultados alentadores que nos acercan cada día más a la obtención de fracciones enriquecidas y compuestos potencialmente útiles para el tratamiento del cáncer que, a futuro, puedan ser incluidas en el listado de alternativas terapéuticas o coadyuvantes de tratamiento contra este grave problema de salud pública.

A lo largo de este documento de tesis doctoral, hemos mostrado las contribuciones que se han desarrollado para aportar nuestro grano de arena para solucionar la problemática que se presenta con los tratamientos actuales contra el cáncer, obteniéndose resultados muy prometedores. En cuanto a la identificación de fuentes vegetales, evaluamos un total de 31 extractos obtenidos de 29 plantas medicinales que crecen en la región de la Costa Caribe Colombiana. Los resultados revelaron que, de los extractos evaluados, once mostraron tener actividad biológica promisoria, inhibiendo el crecimiento de al menos una línea celular de origen neoplásico, resaltándose dentro de este grupo el extracto obtenido de la especie vegetal *Bursera simaruba* (L.) Sarg., ya que no solo inhibió el crecimiento de todas las líneas estudiadas a concentraciones menores de 25 µg/mL, sino que, además, mostró ser selectivo sobre las líneas de cáncer.

Tradicionalmente esta especie es utilizada para tratar problemas asociados a bronquitis, cálculos biliares y renales, problemas asociados al cutis, diarrea, dolores de cintura, enfermedades venéreas, erisipela, febrífugo, gastritis, hemorragias, problemas hepáticos, hipertensión, infecciones bucodentales, infecciones internas, inflamaciones de piel, problemas asociados a lombrices, pérdida de peso, purificante de sangre, resfriados, salpullido, sangrado nasal, sarampión, tiroides. Del mismo modo se ha reportado el uso de esta especie contra alergias, amigdalitis, diabetes, disentería, enfermedades venéreas, cicatrización de ombligo, diurético, impotencia sexual [47,50]. En nuestro estudio, el extracto obtenido de la corteza mostró una potente actividad y una elevada selectividad citotóxica

contra las líneas neoplásicas, siendo este el extracto escogido para realizar los objetivos de aislamiento, purificación e identificación de metabolitos activos, así como para la elucidación de los posibles mecanismos de acción involucrados en la actividad biológica. Hasta el momento, hemos observado que induce apoptosis sobre células de cáncer colorrectal HT-29 a concentración no tóxica para los fibroblastos normales, lo que la convierte en una alternativa potencialmente útil para continuar identificando los componentes que le confieren la actividad, que en función de los resultados del tamizaje fitoquímico preliminar puede estar relacionada con la presencia de triterpenos y/o esteroides tanto en el extracto total como en su fracción más activa. En cuanto a la toxicidad en animales de experimentación, el extracto total administrado no produjo efectos tóxicos o letales, lo que proporciona una idea adicional acerca de la seguridad del extracto, sin embargo, es necesario continuar su exploración en periodos de administración más prolongados. Continuamos analizando los resultados de la caracterización química con el fin de identificar plenamente los compuestos que pueden conferirle la actividad, así como también los resultados del modelo *in vivo* de CAC inducido con AOM/DSS que dentro de la revisión preliminar hemos observado hallazgos interesantes que requieren de un análisis profundo.

Adicionalmente, identificamos la fracción en diclorometano obtenida del extracto total de los cálices de *P. angulata* (PADF) como una fuente de menor complejidad, pero con mayor actividad biológica que el extracto de donde proviene, que mostró revertir efectos del cáncer colorrectal en el modelo *in vivo* de manera segura y eficaz, evidenciándose en la recuperación de los animales tratados en comparación con los animales enfermos no tratados. En este documento presentamos evidencia científica valiosa acerca de la bioactividad de la fracción PADF, los resultados sugieren que esta fracción es un inhibidor de la progresión del ciclo celular de células de CCR e inductor de apoptosis. En lo que se refiere a la toxicidad *in vivo*, la administración de PADF no produjo efectos genotóxicos (ensayo cometa neutro y prueba de micronúcleos) o mutagénicos (test de Ames) a ninguna de las dosis de evaluación. Por lo tanto, esta fracción se considera segura y no causa daño a las dosis terapéuticas establecidas y constituye una fuente prometedora de moléculas bioactivas que debe continuar siendo estudiada con el fin de aislar y purificar los compuestos responsables de la actividad, así como estudiar a profundidad sus mecanismos de acción de manera más profunda. La mayoría de los productos naturales utilizados actualmente para el tratamiento o prevención de muchas patologías, entre ellas la EII y CCR, son usados como suplementos dietarios de manera concomitante con la terapia farmacológica habitual. Una de las principales razones para esto, es que por lo general existe una deficiencia de estudios que permitan conocer con exactitud aspectos que van más allá de solamente simple actividad biológica, como su toxicidad, biodisponibilidad y propiedades fisicoquímicas, por tanto, lo que mostramos en este trabajo representan evidencia científica valiosa acerca de la bioactividad de los cálices de *P. angulata*.

Por otro lado, en relación a los compuestos evaluados, se contribuyó a la elucidación de mecanismos de acción biológica de dos derivados quinoidales, cuyo núcleo químico estructural proviene originalmente de plantas medicinales con demostrada actividad biológica. Nuestro grupo de investigación, en cooperación con otros grupos nacionales e internacionales, hemos estudiado el núcleo quinoidal base (nafto[2,3-b]furan-4,9-diona) debido a la diversidad de procesos biológicos a través de los cuales estas moléculas ejercen sus efectos, diseñando, además, metodologías que permitan sintetizar nuevas moléculas y

ampliar el conocimiento que se tiene referente a la identificación de las posibles dianas moleculares implicadas en el efecto anticancerígeno observado. Los derivados quinoidales estudiados (Avicequinone B y AKM53) mostraron no ser genotóxicos, de acuerdo a los resultados del test de Ames, cometa neutro e inducción de micronúcleos, mientras que si son capaces de inducir apoptosis y promover arresto en fase G2/M del ciclo celular. Adicionalmente el análisis de la expresión diferencial de genes en células HT-29 evidenció que los compuestos inducen cambios transcripcionales sobre numerosos genes relacionados con respuesta a agentes externos, vías de señalización de interferón y de citoquinas en el sistema inmune. Estos resultados muestran que los derivados quinoidales obtenidos se presentan como potenciales candidatos para la obtención de nuevos agentes útiles en la terapia anti-neoplásica y sientan la base para futuros proyectos encaminados a la elucidación molecular del mecanismo de acción de estos compuestos y el desarrollo de un producto farmacéutico con utilidad a nivel clínico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Teniendo en cuenta que aún se deben analizar datos para divulgar en su totalidad los resultados obtenidos en el proyecto de tesis doctoral, se realizarán varias actividades que permitan la socialización de los hallazgos a la comunidad científica a través de artículos publicados en revistas indexadas. Las siguientes actividades que permitirán complementar los resultados obtenidos:

- Análisis de resultados obtenidos en la evaluación de extractos sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón (A549 y H292) para su publicación.
- Análisis de resultados de obtenidos en los experimentos adicionales relacionados con la identificación de mecanismos de acción del extracto de *B. simaruba* sobre la línea de cáncer colorrectal HT-29 (Clonogenicidad, ensayo de inducción de apoptosis utilizando el kit comercial ab14086 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit with SYTOX de la marca Abcam, pruebas de toxicidad y letalidad a través de la administración en animales de experimentación a la dosis máxima soluble, siguiendo estándares internacionales (OECD-Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) y modelo de cáncer colorrectal asociado a enfermedad inflamatoria intestinal AOM/DSS) que, a la fecha, se encuentran bajo análisis para generar la respectiva publicación y divulgación.
- Análisis del espectro realizado por HPLC-MS del extracto de *B. simaruba* para identificación de metabolitos secundarios presentes.
- Análisis de resultados de los Western Blot realizados con las proteínas extraídas de muestras colónicas de ratón y muestras de células HT-29 con el fin de ver cambios en la expresión de proteínas PCNA, p-38, JNK, ERK, β -catenina, tratadas y no tratadas con el extracto de *B. simaruba*.
- Identificación de metabolitos presentes en la fracción en diclorometano obtenida a partir del extracto total etanólico de cálices de *P. angulata*.

PRODUCCION GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1. **Daneiva Caro**, David Rivera, Yanet Ocampo, Klaus Müller, Luis A. Franco. *A promising naphthoquinone [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl) naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] exerts anti-colorectal cancer activity through ferroptosis and inhibition of MAPK signaling pathway based on RNA sequencing*. Open Chemistry 2020; 18: 1242–1255. doi: 10.1515/chem-2020-0170
2. Yanet Ocampo, **Daneiva Caro**, David Rivera, Jhoan Piermattey, Ricardo Gaitán, Luis A. Franco. *Transcriptome Changes in Colorectal Cancer Cells upon Treatment with Avicequinone B*. Adv Pharm Bull. 2020; 10 (4): 638-647. doi: 10.34172/apb.2020.077
3. Julio Acuña, Jhoan Piermattey, **Daneiva Caro**, Sven Bannwitz, Luis Barrios, Jairo López, Yanet Ocampo, Ricardo Vivas-Reyes, Fabio Aristizábal, Ricardo Gaitán, Klaus Müller and Luis Franco. *Synthesis, anti-proliferative activity evaluation and 3D-QSAR study of naphthoquinone derivatives as potential anti-colorectal cancer agents*. Molecules. 2018. Volume 23, Number 186. DOI 10.3390/molecules23010186
4. **Caro Fuentes, D.**, Ocampo Buendía, Y., Ospina Mateus, L., Salas Díaz, R., Díaz Castillo, F., & Franco Ospina, L. *Extractos del Caribe Colombiano con actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer de pulmón*. Revista Cubana de Farmacia. 2017. Volumén 51, Número 4. Disponible en <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/283/171>

Trabajos en eventos científicos

1. **Caro D.**, Ocampo Y., Cuadro J., Espartero J., Franco L., Salas R. *Metabolite fingerprinting of the major active fraction obtained of Physalis angulata L*. World Conference on Pharmaceutical Chemistry and Clinical Research and 14 th International Conference on Frontiers in Alternative and Traditional Medicine. Noviembre 2019.
2. Luis Franco, Yanet Ocampo, David Rivera, **Daneiva Caro**, Johana Cuadro, Jenny Castro, Coralia Osorio. *Physalis angulata calyces fraction promoted mice recovery in AOM/DSS-induced colon cancer model*. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10). Noviembre 2018.
3. **Daneiva Caro**, Yanet Ocampo, Johana Cuadro, David Rivera, Guillermo Schinella, Rubén Salas, Luis Franco. *Cytotoxic activity of an enriched fraction of Physalis angulata calyces against two human colon cancer cell lines*. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10). Noviembre 2018.

4. Jenny Castro, **Daneiva Caro**, Nelly Mejía, Jaime Salgado, Daniela Amaris, Jesus Cortéz, Luis Franco, Rubén Salas. *Cape gooseberry (Physalis peruviana) modulates the release of inflammatory mediators in LPS-activated RAW 264.7 macrophages*. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10). Noviembre 2018.
5. Ocampo Y, Rivera D, **Caro D**, Cuadro J, Castro J, Zabaleta D, Romero C, Franco L. *In vitro and In vivo anti-colorectal cancer activity of the calyces from Physalis angulata*. VI Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales COLAPLAMED. Agosto 2018.
6. **Caro D**, Ospina L, Ocampo Y, Angulo A, Jiménez K, Castro J, Díaz F, Salas R, Franco L. *In vitro antineoplastic effect of plant extracts used in the colombian traditional medicine against two cancer cell lines*. XXVI SILAE Congress. Septiembre 2017.
7. Rivera D, Ocampo Y, **Caro D**, Franco L. *Anti-neoplastic potential of the primary fraction from the calyces of Physalis angulata L*. XXVI SILAE Congress. Septiembre 2017.
8. Rivera D., Ocampo Y., **Caro D.**, Jose Luis Espartero, Franco L. *Assessment of the citotoxic potential of Physalis angulata calyces on the HT-29 cancer cell line through bioguided fractionation*. V Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales COLAPLAMED. Agosto 2017.
9. **Caro D.**, Bolívar S., Ospina L., Ocampo Y., Castro, J., Barrios L., Vázquez, J., Chávez D., Díaz F., Franco L.A. *Antiproliferative activity of extract and fractions obtained of Trichilia hirta seeds against HT-29 cells*. V Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales COLAPLAMED. Agosto 2017.
10. **Caro D**, Ocampo Y, Bolívar S, Díaz F, Aristizábal FA, Franco LA. *Bioguided fractionation of Trichilia hirta seeds extract with cytotoxic activity against a breast cancer cell line*. XXV SILAE Congress. Septiembre 2016.
11. **Caro D**, Ocampo Y, Bolívar S, Díaz F, Salas RD, Aristizábal FA, Franco LA. *Cytotoxic effect of ethanolic extract and fractions from Croton malambo bark against MDA-MB-231 cell line*. XXV SILAE Congress. Septiembre 2016.
12. Ocampo Y, Rivera D, Acuña J, **Caro D**, Castro J, Olivero J, Motilva V, Müller K, Franco L. *Cytotoxicity of DQ-35 is mediated by G2-arrest and micronuclei formation without nuclear damage*. XXV SILAE Congress. Septiembre 2016.
13. **D.C. Caro F.**, S.J. Bolivar A., F. Díaz C., L.A. Franco O. *Fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de hojas de Hippomane mancinella usando la línea de cáncer de mama MDA-MB-231*. V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat. Abril 2016.
14. **Caro Daneiva**, Teherán Víctor, Ocampo Yanet, Salas Rubén, Díaz Fredyc, Franco Luis. *Efecto citotóxico de plantas de la Costa Caribe Colombiana en cultivos de cáncer de pulmón, colorectal y próstata*. III Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales-Antonio Brack Egg. Agosto 2015.
15. L.A. Franco, **Daneiva Caro Fuentes**, V. Teherán, Y.C. Ocampo, R. Salas and F. Diaz. *Colombian Caribbean plant extracts with cytotoxic effect against human cancer cells*. Drug Discovery and Therapy World Congress 2015. Julio 2015.

Distinciones, reconocimientos, becas y estancias de investigación

1. Candidato seleccionado en la Quinta convocatoria de financiación para la participación en eventos científicos para docentes de planta y estudiantes adscritos a grupos de investigación clasificados por el Departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación – COLCIENCIAS en las categorías A1, A, B, C y avalados por la Universidad de Cartagena (Resolución 01481 de 2019). Evento Científico: World Conference on Pharmaceutical Chemistry and Clinical Research. Lugar: Valencia, España. Fecha de inicio: 25 de noviembre de 2019; fecha de terminación: 26 de noviembre de 2019.
2. Beca otorgada por la Universidad de Cartagena en la convocatoria del año 2019 para la realización de pasantías internacionales de estudiantes adscritos a grupos de investigación categorizados por el Departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación-COLCIENCIAS en las categorías A1, A, B Y C y avalados por la Universidad de Cartagena. (Resolución 01478 de 2019). Lugar: Sevilla, España. Fecha de inicio: 11 de octubre de 2019; fecha de terminación: 24 de noviembre de 2019.
3. Poster award in 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10). Lugar: Atenas, Grecia. Fecha 29 de noviembre de 2018.
4. Beca otorgada en la CONVOCATORIA 2018 del programa de movilidad académica entre universidades andaluzas e iberoamericanas asociadas a la Asociación Universitaria Iberoamericana De Postgrado, AUIP. Lugar: Sevilla, España. Fecha de inicio: 16 de noviembre de 2018; fecha de terminación: 16 de enero de 2018.
5. Candidato seleccionado en la Primera convocatoria de financiación para la participación en eventos científicos para docentes de planta y estudiantes adscritos a grupos de investigación visibles (categorizados o reconocidos-convocatoria 693-2014) en la plataforma SCIENTI del Departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación-COLCIENCIAS y avalados por la Universidad de Cartagena. (Resolución 01851 de 2016). Evento Científico: XXV Italo-Latin American Congress of Ethnomedicine, SILAE 2016. Lugar: Modena, Italia. Fecha de inicio: 11 de septiembre de 2016; fecha de terminación: 15 de septiembre de 2016.
6. Beca otorgada en la CONVOCATORIA 2016 por el programa de movilidad académica entre universidades andaluzas e iberoamericanas asociadas a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado, AUIP. Lugar: Sevilla, España. Fecha de inicio: 1 de septiembre de 2016; fecha de terminación: 01 de octubre de 2016.
7. Beca obtenida en la CONVOCATORIA 647 Doctorados Nacionales 2014 otorgada por COLCIENCIAS. Lugar: Colombia. Fecha de inicio: 09 de febrero de 2015; fecha de terminación: 31 de diciembre de 2018. (Resolución 0041 de 22 de enero de 2015)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Acuña J, Piermattey J, Caro D, et al. Synthesis, anti-proliferative activity evaluation and 3D-QSAR study of naphthoquinone derivatives as potential anti-colorectal cancer agents. *Molecules* 2018; 23: 1–21. doi:10.3390/molecules23010186
- [2] Ito C, Katsuno S, Kondo Y, et al. Chemical constituents of *Avicennia alba*. Isolation and structural elucidation of new naphthoquinones and their analogues. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000; 48: 339–343. doi:10.1248/cpb.48.339
- [3] World Health Organization. Cancer. Heal Top. Im Internet: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1; Stand: 22.04.2021
- [4] Alberts B, Hopkin K, Johnson A, et al. *Essential cell biology*. Fifth. Beauceville, Quebec: W. W. Norton & Company, Inc; 2019
- [5] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021: caac.21660. doi:10.3322/caac.21660
- [6] Akazawa H. [Cardiotoxicity of Cancer Chemotherapy - Mechanisms and Therapeutic Approach]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2017; 44: 2058–2063. Im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29361617>; Stand: 07.08.2019
- [7] Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 206–212. doi:10.1016/J.ADDR.2012.09.033
- [8] Mocan T, Iancu C. Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 1945. doi:10.2147/IJN.S24060
- [9] Van Houdt WJ, Emmink BL, Pham T V., et al. Comparative proteomics of colon cancer stem cells and differentiated tumor cells identifies BIRC6 as a potential therapeutic target. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10: 1–11. doi:10.1074/mcp.M111.011353
- [10] Grkovic T, Akee RK, Thornburg CC, et al. National Cancer Institute (NCI) Program for Natural Products Discovery: Rapid Isolation and Identification of Biologically Active Natural Products from the NCI Prefractionated Library. *ACS Chem Biol* 2020; 15: 1104–1114. doi:10.1021/acscchembio.0c00139
- [11] International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. Global Cancer Observatory: Colombia fact sheets. *Globocan 2020* 2020. Im Internet: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>; Stand: 22.04.2021
- [12] Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 2014; 507: 455–461. doi:10.1038/nature12787
- [13] Iwasa J, Marshall W. *KARP Biología celular y molecular Conceptos y experimentos*. Octava. Ciudad de México: McGraw Hill Interamericana editores S.A. de C.V.; 2018

- [14] Safarzadeh E, Shotorbani SS, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull* 2014; 4: 421–427. doi:10.5681/apb.2014.062
- [15] Guerini I. DNA repair pathways poster | Abcam. . Im Internet: https://www.abcam.com/pathways/dna-repair-pathways-poster?utm_source=Eloqua&utm_medium=Email&utm_campaign=Protein Arginine Methylation %7CEngage%7C2021-05-06 19%3A00%3A00.000%7CN%2FA%7CGLOBAL%7CEN%7CEvent - Abcam Conference&mi_u=957801; Stand: 21.06.2021
- [16] Li G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008; 18: 85–98. doi:10.1038/cr.2007.115
- [17] Yahya EB, Alqadhi AM. Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery. *Life Sci* 2021; 269: 119087. doi:10.1016/J.LFS.2021.119087
- [18] Makin G. Principles of chemotherapy. *Paediatr Child Heal (United Kingdom)* 2018; 28: 183–188. doi:10.1016/j.paed.2018.02.002
- [19] González Agudelo MA, Lopera Lotero WD, Arango Villa AI. *Fundamentos de Medicina - Manual de Terapéutica 2018-2019*. Decimotav. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas CIB; 2018
- [20] Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, et al. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 945–972. doi:10.1016/J.JEP.2010.11.055
- [21] Ministerio de la Protección Social. Resolución 2834 de 2008. Bogotá, Colombia: Institute for Medicinal Plants Research "Dr. Josif Pančić; 2008. Im Internet: [file:///C:/Users/Microscopios/Downloads/RESOLUCION NUMERO 2834 DE 2008.pdf](file:///C:/Users/Microscopios/Downloads/RESOLUCION%20NUMERO%202834%20DE%202008.pdf)
- [22] Ministerio de la Protección Social. *Vademécum Colombiano de Plantas medicinales*. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA); 2008. Im Internet: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/vademecum-colombiano-plantas-medicinales.pdf>
- [23] Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh J Pharmacol* 2006; 1: 35–41. doi:10.3329/bjp.v1i2.486
- [24] Cragg G, Newman D, Snader K. Natural Products in Drug Discovery and Development. *J Nat Prod* 1997; 60: 52–60. doi:10.1021/np9604893
- [25] Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2021 203 2021; 20: 200–216. doi:10.1038/s41573-020-00114-z
- [26] Singh Asha, Masoodi M, Nabi N, et al. Medicinal plants as combating strategy against cancer: A review. *Int J Sci Res* 2019; 7: 427–446. Im Internet: http://www.ijssr.co.in/images/full_pdf/1555241885_SB5.pdf; Stand: 08.08.2019

- [27] Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 364–369. doi:10.1016/S1471-4892(01)00063-7
- [28] Manosroi A, Akazawa H, Akihisa T, et al. In vitro anti-proliferative activity on colon cancer cell line (HT-29) of Thai medicinal plants selected from Thai/Lanna medicinal plant recipe database “MANOSROI III”. *J Ethnopharmacol* 2015; 161: 11–17. doi:10.1016/j.jep.2014.11.038
- [29] Manosroi J, Sainakham M, Manosroi W, et al. Anti-proliferative and apoptosis induction activities of extracts from Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *J Ethnopharmacol* 2012; 141: 451–459. doi:10.1016/j.jep.2012.03.010
- [30] Beltrán Villanueva CE, Díaz Castillo F, Gómez Estrada H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana Preliminary phytochemical screening of promising plant species of the Colombian Atlantic coast. *Rev Cuba Plantas Med* 2013; 18: 619–631. Im Internet: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000400013&script=sci_arttext&tlng=pt
- [31] Durán R, Fournet J, Jiménez F, et al. TRAMILoteca | TRAMIL. . Im Internet: <http://www.tramil.net/es/tramilotheque>; Stand: 03.08.2019
- [32] Herrera Herrera A, Franco Ospina L, Fang L, et al. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* to Antibacterial Effect from *Mammea americana*. *Adv Pharmacol Sci* 2014; 2014: 1–6. doi:10.1155/2014/384815
- [33] Caro Fuentes D del C, Ocampo Buendía YC, Ospina Mateus LC, et al. Extractos del Caribe Colombiano con actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer de pulmón | Caro Fuentes | Revista Cubana de Farmacia. *Rev Cuba Farm* 2017; 51: 1–14. Im Internet: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/283/171>; Stand: 06.10.2021
- [34] Khorombi TE, Fouché G, Kolesnikova NI, et al. Investigation of South African plants for anti cancer properties. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 494–500. Im Internet: <http://hdl.handle.net/10204/826>
- [35] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- [36] Choi EJ, Jung JY, Kim G-H. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER α expression and induction of apoptosis. *Exp Ther Med* 2014; 8: 454–458. doi:10.3892/etm.2014.1771
- [37] Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006; 1: 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- [38] Yang X. Clonogenic Assay. *bio-protocol* 2012; 2: 1–3. doi:10.21769/BioProtoc.187
- [39] Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 1999; 70. doi:10.1093/ajcn/70.3.491s

- [40] Gautam Y, Dwivedi S, Srivastava A, et al. 2-(3',4'-Dimethoxybenzylidene)tetralone induces anti-breast cancer activity through microtubule stabilization and activation of reactive oxygen species. *RSC Adv* 2016; 6: 33369–33379. doi:10.1039/C6RA02663J
- [41] Jayarathna P, Tennekoon K, Samarakoon S, et al. Cytotoxic, Antioxidant and Apoptotic Effects of Twenty Sri Lankan Endemic Plants in Breast Cancer Cells. *European J Med Plants* 2016; 15: 1–15. doi:10.9734/EJMP/2016/26591
- [42] Badisa RB, Ayuk-Takem LT, Ikediobi CO, et al. Selective anticancer activity of pure licamichauxiolic-B acid in cultured cell lines. *Pharm Biol* 2006; 44: 141–145. doi:10.1080/13880200600592301
- [43] Maldini M, Montoro P, Piacente S, et al. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 2009; 70: 641–649. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.02.009
- [44] Sylvestre M, Longtin APA, Legault J. Volatile Leaf Constituents and Anticancer Activity of *Bursera Simaruba* (L.) Sarg. Essential Oil. *Nat Prod Commun* 2007; 2: 1934578X0700201. doi:10.1177/1934578X0700201217
- [45] Columba-Palomares MFMC, Villareal DML, Acevedo Quiroz MCME, et al. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Bursera copallifera*. *Pharmacogn Mag* 2015; 11: S322-8. doi:10.4103/0973-1296.166067
- [46] Domínguez F, Maycotte P, Acosta-Casique A, et al. *Bursera copallifera* Extracts Have Cytotoxic and Migration-Inhibitory Effects in Breast Cancer Cell Lines. *Integr Cancer Ther* 2018; 17: 654–664. doi:10.1177/1534735418766416
- [47] Gonzalez L, Villarreal ML, Acevedo M, et al. Cytotoxic and Anti-inflammatory Activities of *Bursera* species from Mexico. *Clin Toxicol* 2015; 5: 1–8. doi:10.4172/2161-0495.1000232
- [48] Bah M, Gutiérrez-Avella DM, Mendoza S, et al. Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas* 2014; 13: 527–536. Im Internet: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85632545003>; Stand: 04.08.2019
- [49] Junor G-AO, Porter RBR, Yee TH. The Chemical Composition of the Essential Oils from the Leaves, Bark and Fruits of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. from Jamaica. *J Essent Oil Res* 2008; 20: 426–429. doi:10.1080/10412905.2008.9700048
- [50] Setzer WN. Leaf and Bark Essential Oil Compositions of *Bursera simaruba* from Monteverde, Costa Rica. 2014. Im Internet: <http://www.essencejournal.com/vol1/issue3/pdf/10.1.pdf>; Stand: 03.08.2019
- [51] Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep* 2006; 23: 394. doi:10.1039/b515312n
- [52] M.R. Patlolla J, V. Rao C. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 147–155.

doi:10.2174/138920112798868719

- [53] Herzog E, Casey A, Lyng FM, et al. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials—The clonogenic assay. *Toxicol Lett* 2007; 174: 49–60. doi:10.1016/J.TOXLET.2007.08.009
- [54] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7–30. doi:10.3322/CAAC.21332
- [55] Ospina M. ML, Huertas JA, Montaña C. JI, et al. Observatorio Nacional de Cáncer Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública* 2015; 33: 262–276. doi:10.17533/udea.rfnsp.v33n2a13
- [56] Azzoli CG, Baker SJ, Temin S, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6251. doi:10.1200/JCO.2009.23.5622
- [57] Li Y, Yang F, Zheng W, et al. Punica granatum (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. *Biomed Pharmacother* 2016; 80: 227–235. doi:10.1016/J.BIOPHA.2016.03.023
- [58] Fonnegra-Gómez R, Villa-Londoño J. Plantas medicinales usadas en algunas veredas de municipios del altiplano del oriente antioqueño, Colombia. *Actual Biol* 2011; 33: 219–250. Im Internet: [https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/Actual Biol 33 %2895%29%3A 219-250%2C 2011/12593](https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/Actual_Biol_33_%2895%29%3A_219-250%2C_2011/12593)
- [59] Costa do Vale JP, Batista Gonçalves F, Teixeira da Silva P, et al. Isolation and antioxidant activity of chemical constituents from *Vitex gardneriana* Schauer. *J Pharmacogn Phytochem* 2017; 6: 1806–1811. Im Internet: <https://www.phytojournal.com/archives/?year=2017&vol=6&issue=6&ArticleId=2299>; Stand: 18.07.2021
- [60] Hernández Sosa E, Mora González N, Morris Quevedo HJ, et al. Cytotoxic activity of water extracts of *Trichilia hirta* leaves on human tumor cells. *Rev Cuba Investig Biomédicas* 2013; 32. Im Internet: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=40592>; Stand: 18.07.2021
- [61] Kareru PG, Keriko JM, Kenji GM, et al. Anti-termite and antimicrobial properties of paint made from *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. oil extract. *African J Pharm Pharmacol* 2010; 4: 087–089. doi:10.5897/AJPP.9000034
- [62] Gata-Gonçalves L, Nogueira JMF, Matos O, et al. Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *J Photochem Photobiol B Biol* 2003; 70: 51–54. doi:10.1016/S1011-1344(03)00024-1
- [63] Tewtrakul S, Nakamura N, Hattori M, et al. Flavanone and Flavonol Glycosides from the Leaves of *Thevetia peruviana* and Their HIV-1 Reverse Transcriptase and HIV-1 Integrase Inhibitory Activities. *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 630–635. doi:10.1248/CPB.50.630

- [64] Ramos-Silva A, Tavares-Carreón F, Figueroa M, et al. Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract. *BMC Complement Altern Med* 2017 171 2017; 17: 1–11. doi:10.1186/S12906-017-1727-Y
- [65] Cheng H-Y, Tian D-M, Tang J-S, et al. Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana* and their pro-apoptotic activity toward cancer cells. <http://dx.doi.org/101080/1028602020161170814> 2016; 18: 837–847. doi:10.1080/10286020.2016.1170814
- [66] Gómez-Calderón C, Mesa-Castro C, Robledo S, et al. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. *BMC Complement Altern Med* 2017 171 2017; 17: 1–12. doi:10.1186/S12906-017-1562-1
- [67] Hernández-Castro C, Diaz-Castillo F, Martínez-Gutierrez M. Ethanol extracts of *Cassia grandis* and *Tabernaemontana cymosa* inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2. *Asian Pacific J Trop Dis* 2015; 5: 98–106. doi:10.1016/S2222-1808(14)60635-6
- [68] Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* 2004; 93: 123–132. doi:10.1016/J.JEP.2004.03.035
- [69] Li CJ, Tsang SF, Tsai CH, et al. *Momordica charantia* extract induces apoptosis in human cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Evidence-based Complement Altern Med* 2012; 2012. doi:10.1155/2012/261971
- [70] Wang X, Sun W, Cao J, et al. Structures of New Triterpenoids and Cytotoxicity Activities of the Isolated Major Compounds from the Fruit of *Momordica charantia* L. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 3927–3933. doi:10.1021/JF204208Y
- [71] Rosado Veja JR, Moreno Fernández MI. Farmacopea guajira: el uso de las plantas medicinales xerofíticas por la etnia wayuu *Pharmacopoeia guajira: the use of medicinal xerophytic plants by wayuu ethnicity*. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 2010; 41: 1–10. Im Internet: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509064.pdf>; Stand: 20.07.2021
- [72] Muñoz-Acevedo A, Puerto CE, Rodríguez JD, et al. Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente mayoritario, metileugenol. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas* 2014; 13: 336–343. Im Internet: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85631435003.pdf>; Stand: 20.07.2021
- [73] Mendoza-Meza D, Benavides-Henríquez H, Taborda-Martínez ME. Actividad acaricida del aceite esencial de la corteza de *Croton malambo* H. Karst, metileugenol y metil-iso Eugenol contra *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas* 2014; 13: 537–544. Im Internet: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85632545004.pdf>; Stand: 20.07.2021
- [74] Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *J Ethnopharmacol*

2003; 88: 11–14. doi:10.1016/S0378-8741(03)00179-X

- [75] Morales A, Pérez P, Mendoza R, et al. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett* 2005; 218: 109–116. doi:10.1016/J.CANLET.2004.07.009
- [76] Espinosa Torres JA. Estudio químico biodirigido contra virus el dengue del extracto etanólico de dos Plantas Del Caribe Colombiano: croton malambo karst y cappariss odoratissima Jacq. 2011. Im Internet: <https://repositorio.unicartagena.edu.co/handle/11227/5809>; Stand: 20.07.2021
- [77] OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. 2002. doi:10.1787/9789264071001-en
- [78] Mazova N, Popova V, Stoyanova A. Phytochemical composition and biological activity of *Physalis* spp.: A mini-review. *Food Sci Appl Biotechnol* 2020; 3: 1–15. doi:10.30721/fsab2020.v3.i1.80
- [79] *Physalis* — The Plant List. Version 1. 2010. Im Internet: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Solanaceae/Physalis/>; Stand: 05.02.2020
- [80] Rengifo-Salgado E, Vargas-Arana G. *Physalis angulata* L. (Bolsa Mullaca): A Review of its Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas* 2013; 12: 431–445. Im Internet: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85628390001>; Stand: 17.02.2020
- [81] Zhang W-N, Tong W-Y. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Physalis*. *Chem Biodivers* 2016; 13: 48–65. doi:10.1002/cbdv.201400435
- [82] Cobaleda-Velasco M, Alanis-Bañuelos RE, Almaraz-Abarca N, et al. Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L. as quality indicators. *J Pharm Pharmacogn Res* 2017; 5: 114–128. Im Internet: http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/8715/0719-4250_5_2_114.pdf?sequence=1&isAllowed=y; Stand: 07.02.2020
- [83] Rivera D, Ocampo Y, Franco LA. *Physalis angulata* Calyces Modulate Macrophage Polarization and Alleviate Chemically Induced Intestinal Inflammation in Mice. *Biomedicines* 2020; 8: 24. doi:10.3390/biomedicines8020024
- [84] Rivera DE, Ocampo YC, Castro JP, et al. A screening of plants used in Colombian traditional medicine revealed the anti-inflammatory potential of *Physalis angulata* calyces. *Saudi J Biol Sci* 2019. doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.030
- [85] Rivera DE, Ocampo YC, Castro JP, et al. Antibacterial activity of *Physalis angulata* L., *Merremia umbellata* L., and *Cryptostegia grandiflora* Roxb. Ex R.Br. - medicinal plants of the Colombian Northern Coast. *Orient Pharm Exp Med* 2015; 15: 95–102. doi:10.1007/s13596-014-0176-0
- [86] Nebbia M, Yassin NA, Spinelli A. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg* 2020; 33: 305–317. doi:10.1055/s-0040-1713748

- [87] Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2007; 2: 1998–2004. doi:10.1038/nprot.2007.279
- [88] Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, et al. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 238–245. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00878.x
- [89] Ballesteros-Vivas D, Alvarez-Rivera G, León C, et al. Anti-proliferative bioactivity against HT-29 colon cancer cells of a withanolides-rich extract from golden berry (*Physalis peruviana* L.) calyx investigated by Foodomics. *J Funct Foods* 2019; 63: 103567. doi:10.1016/j.jff.2019.103567
- [90] Franco LA, Ocampo YC, Gómez HA, et al. Sucrose Esters from *Physalis peruviana* Calyces with Anti-Inflammatory Activity. *Planta Med* 2014; 80: 1605–1614. doi:10.1055/s-0034-1383192
- [91] Zhang C-R, Khan W, Bakht J, et al. New antiinflammatory sucrose esters in the natural sticky coating of tomatillo (*Physalis philadelphica*), an important culinary fruit. *Food Chem* 2016; 196: 726–732. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.007
- [92] Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: An update. *Mol Carcinog* 2013; 52: 167–182. doi:https://doi.org/10.1002/mc.21844
- [93] Zibaei Z, Babaei E, Rezaie Nezhad Zamani A, et al. Curcumin-enriched Gemini surfactant nanoparticles exhibited tumoricidal effects on human 3D spheroid HT-29 cells in vitro. *Cancer Nanotechnol* 2021; 12: 3. doi:10.1186/s12645-020-00074-4
- [94] Stark GR, Taylor WR. Analyzing the G2/M checkpoint. In: *Checkpoint Controls and Cancer. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press; 2004: 51–82. doi:10.1385/1-59259-788-2:051
- [95] Chinnasamy S, Zameer F, Muthuchelian K. Molecular and Biological Mechanisms of Apoptosis and its Detection Techniques. *J Oncol Sci* 2020; 6: 49–64. doi:10.37047/jos.2020-73477
- [96] Thaker AI, Shaker A, Suprada Rao M, et al. Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp* 2012: 4100. doi:10.3791/4100
- [97] De Robertis M, Massi E, Poeta M, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* 2011; 10. doi:10.4103/1477-3163.78279
- [98] Giner E, Recio MC, Ríos JL, et al. Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 242–255. doi:10.1002/mnfr.201500605
- [99] Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, et al. Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon

- carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1319–1327. doi:10.1093/carcin/21.7.1319
- [100] Tang A, Li N, Li X, et al. Dynamic activation of the key pathways: linking colitis to colorectal cancer in a mouse model. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1375–1383. doi:10.1093/carcin/bgs183
- [101] KRAS gene - Genetics Home Reference - NIH. 2020. Im Internet: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS>; Stand: 09.03.2020
- [102] Vivona AA, Shpitz B, Medline A, et al. K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1777–1781. doi:10.1093/carcin/14.9.1777
- [103] Bragado P, Armesilla A, Silva A, et al. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 α MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 2007; 12: 1733–1742. doi:10.1007/s10495-007-0082-8
- [104] Cheung KL, Khor TO, Yu S, et al. PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway. *AAPS J* 2008; 10: 277–281. doi:10.1208/s12248-008-9032-9
- [105] Gupta J, Nebreda AR. Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J* 2015; 282: 1841–1857. doi:10.1111/febs.13250
- [106] Weidong L, Chunsheng L, Honggang Z, et al. Therapeutic targets of Traditional Chinese Medicine for colorectal cancer. *J Tradit Chinese Med* 2016; 36: 243–249. doi:10.1016/s0254-6272(16)30034-6
- [107] Hu R, Kim BR, Chen C, et al. The roles of JNK and apoptotic signaling pathways in PEITC-mediated responses in human HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1361–1367. doi:10.1093/carcin/bgg092
- [108] Verma RP. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 6: 489–499. doi:10.2174/187152006778226512
- [109] Montenegro RC, Araújo AJ, Molina MT, et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 439–448. doi:10.1016/J.CBI.2010.01.041
- [110] Tan W, Lu J, Huang M, et al. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese Med* 2011 61 2011; 6: 1–15. doi:10.1186/1749-8546-6-27
- [111] Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, et al. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. <http://dx.doi.org/101146/annurev-pharmtox-010611-134517> 2012; 52: 221–247. doi:10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010611-134517
- [112] Kerry RG, Pradhan P, Das G, et al. Anticancer Potential of Mangrove Plants: Neglected Plant Species of the Marine Ecosystem. In: *Anticancer plants: Properties and Application*. Springer, Singapore; 2018: 303–325. doi:10.1007/978-981-10-8548-2_13

- [113] Lugo AE. Conserving Latin American and Caribbean mangroves: issues and challenges. *Madera y Bosques* Número Espec 2002; 8: 5–25. doi:10.21829/myb.2002.801289
- [114] Thatoi H, Samantaray D, Das SK. The genus *Avicennia*, a pioneer group of dominant mangrove plant species with potential medicinal values: a review. <https://doi.org/10.1080/2155376920161235619> 2016; 9: 267–291. doi:10.1080/21553769.2016.1235619
- [115] Han L, Huang X, Dahse H-M, et al. Unusual Naphthoquinone Derivatives from the Twigs of *Avicennia marina*. *J Nat Prod* 2007; 70: 923–927. doi:10.1021/NP060587G
- [116] Assaw S, Isyraq M, Mohd H, et al. Antibacterial and antioxidant activity of naphthofuranquinones from the twigs of tropical mangrove *Avicennia officinalis* naphthofuranquinones from the twigs of tropical. Taylor & Francis; 2019. doi:10.1080/14786419.2018.1538220
- [117] Sutton D, Gillan F, Susic M. Naphthofuranone phytoalexins from the grey mangrove, *Avicennia marina*. *Phytochemistry* 1985; 24: 2877–2879. doi:10.1016/0031-9422(85)80018-2
- [118] Prateep A, Sumkhemthong S, Karnsomwan W, et al. Avicenninone B sensitizes anoikis in human lung cancer cells. *J Biomed Sci* 2018; 25: 1–11. doi:10.1186/s12929-018-0435-3.
- [119] Tseng CH, Chen YL, Yang SH, et al. Synthesis and antiproliferative evaluation of certain iminonaphtho[2,3-b]furan derivatives. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 5172–5182. doi:10.1016/J.BMC.2010.05.062
- [120] Lin KL, Su JC, Chien CM, et al. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione disrupts Janus kinase-2 and induces apoptosis in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Toxicol Vitr* 2010; 24: 1158–1167. doi:10.1016/J.TIV.2010.02.019
- [121] Su JC, Lin KL, Chien CM, et al. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione inactivates EGFR and PI3K/Akt signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Life Sci* 2010; 86: 207–213. doi:10.1016/J.LFS.2009.12.006
- [122] Jia R, Guo Y-W, Hou H-X. Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina*. *Chin J Nat Med* 2004; 2: 16–19. Im Internet: Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina*.
- [123] Koyanagi J, Yamamoto K, Nakayama K, et al. A short-step synthesis of naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione. *J Heterocycl Chem* 1994; 31: 1303–1304. doi:10.1002/JHET.5570310534
- [124] Lee YR, Kim BS, Jung YU, et al. Facile synthesis of Avicenninone-B natural product. *Synth Commun* 2002; 32: 3099–3105. doi:10.1081/SCC-120013719
- [125] Zaidi MR, Merlino G. The Two Faces of Interferon- γ in Cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6118–6124. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0482
- [126] Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for

cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 131–144. doi:10.1038/nrc.2016.14

- [127] Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 545–558. doi:10.1038/s41577-018-0029-z
- [128] Dai W, Li Y, Mo S, et al. A robust gene signature for the prediction of early relapse in stage I–III colon cancer. *Mol Oncol* 2018; 12: 463–475. doi:10.1002/1878-0261.12175
- [129] E G, M A, C V, et al. Overexpression of NDP kinase nm23 associated with ploidy image analysis in colorectal cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 2049–2053. Im Internet: <https://europepmc.org/article/med/8572601>; Stand: 23.08.2021
- [130] Andreu P, Colnot S, Godard C, et al. Identification of the IFITM Family as a New Molecular Marker in Human Colorectal Tumors. *Cancer Res* 2006; 66: 1949–1955. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2731
- [131] He J, Luo H, Li J, et al. Influences of the interferon induced transmembrane protein 1 on the proliferation, invasion, and metastasis of the colorectal cancer SW480 cell lines. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125. Im Internet: https://journals.lww.com/cmj/Fulltext/2012/02010/Influences_of_the_interferon_induced_transmembrane.21.aspx
- [132] He J, Li J, Feng W, et al. Prognostic significance of INF-induced transmembrane protein 1 in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 16007–16013. Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26884876>
- [133] Yu F, Xie D, Ng SS, et al. IFITM1 promotes the metastasis of human colorectal cancer via CAV-1. *Cancer Lett* 2015; 368: 135–143. doi:10.1016/J.CANLET.2015.07.034
- [134] Sari NI, Yang Y-G, Phi LTH, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) is required for the progression of colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 86039–86050. doi:10.18632/ONCOTARGET.13325
- [135] Xu L, Wang R, Ziegelbauer J, et al. Transcriptome analysis of human colorectal cancer biopsies reveals extensive expression correlations among genes related to cell proliferation, lipid metabolism, immune response and collagen catabolism. *Oncotarget* 2017; 8: 74703–74719. doi:10.18632/ONCOTARGET.20345
- [136] K C, H W, S Z, et al. [Expression of IFITM3 in colorectal carcinoma and its clinical significance]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2015; 37: 352–355. Im Internet: <https://europepmc.org/article/med/26463025>; Stand: 23.08.2021
- [137] Mei Z, Wang G, Liang Z, et al. Prognostic value of IRF-2 expression in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 38969–38977. doi:10.18632/ONCOTARGET.17163
- [138] Fernández LP, Ramos-Ruiz R, Herranz J, et al. The transcriptional and mutational landscapes of lipid metabolism-related genes in colon cancer. *Oncotarget* 2018; 9: 5919–5930. doi:10.18632/ONCOTARGET.23592
- [139] Croner RS, Stürzl M, Rau TT, et al. Quantitative proteome profiling of lymph node-

- positive vs. -negative colorectal carcinomas pinpoints MX1 as a marker for lymph node metastasis. *Int J Cancer* 2014; 135: 2878–2886. doi:10.1002/IJC.28929
- [140] Wagner S, Vlachogiannis G, De Haven Brandon A, et al. Suppression of interferon gene expression overcomes resistance to MEK inhibition in KRAS-mutant colorectal cancer. *Oncogene* 2019; 38: 1717–1733. doi:10.1038/s41388-018-0554-z
- [141] Kuo Y-B, Chan C-C, Chang CA, et al. Identification of Phospholipid Scramblase 1 as a Biomarker and Determination of Its Prognostic Value for Colorectal Cancer. *Mol Med* 2011; 17: 41–47. doi:10.2119/molmed.2010.00115
- [142] Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, et al. RIG-I/MDA5/MAVS Are Required To Signal a Protective IFN Response in Rotavirus-Infected Intestinal Epithelium. *J Immunol* 2011; 186: 1618–1626. doi:10.4049/JIMMUNOL.1002862
- [143] Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* 2012; 32: 2601–2613. doi:10.1038/onc.2012.347
- [144] Luker KE, Pica CM, Schreiber RD, et al. Overexpression of IRF9 Confers Resistance to Antimicrotubule Agents in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6540–6547. Im Internet: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/17/6540.abstract>
- [145] Rigby RJ, Simmons JG, Greenhalgh CJ, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene* 2007; 26: 4833–4841. doi:10.1038/sj.onc.1210286
- [146] Culig Z. Suppressors of cytokine signalling-3 and -1 in human carcinogenesis. *Front Biosci Sch* 2013; 5: 283
- [147] Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 451: 1–14. doi:10.1016/J.MCE.2017.05.033
- [148] Löcken H, Clamor C, Müller K. Napabucasin and Related Heterocycle-Fused Naphthoquinones as STAT3 Inhibitors with Antiproliferative Activity against Cancer Cells. *J Nat Prod* 2018; 81: 1636–1644. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00247
- [149] Lu B, Chen XB, Ying MD, et al. The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front Pharmacol* 2018; 8: 1–8. doi:10.3389/FPHAR.2017.00992
- [150] Luque-García JL, Martínez-Torrecedrada JL, Epifano C, et al. Differential protein expression on the cell surface of colorectal cancer cells associated to tumor metastasis. *Proteomics* 2010; 10: 940–952. doi:10.1002/pmic.200900441
- [151] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Harris AL, et al. Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2010; 63: 867–872. doi:10.1136/JCP.2010.079525
- [152] Wei M-F, Chen M-W, Chen K-C, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* 2014; 10: 1179–1192. doi:10.4161/AUTO.28679

- [153] Bauer K, Nitsche U, Slotta-Huspenina J, et al. High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. *Cell Oncol* 2012; 35: 197–205. doi:10.1007/S13402-012-0079-3
- [154] Tsuruta M, Nishibori H, Hasegawa H, et al. Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer. *Oncol Rep* 2008; 20: 1165–1172. doi:10.3892/OR_00000125
- [155] Arrigo A-P, Viot S, Chaufour S, et al. Hsp27 Consolidates Intracellular Redox Homeostasis by Upholding Glutathione in Its Reduced Form and by Decreasing Iron Intracellular Levels. <https://home.liebertpub.com/ars> 2005; 7: 414–424. doi:10.1089/ARS.2005.7.414
- [156] Chen H, Zheng C, Zhang Y, et al. Heat shock protein 27 downregulates the transferrin receptor 1-mediated iron uptake. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1402–1416. doi:10.1016/J.BIOCEL.2006.02.006
- [157] Sun X, Ou Z, Xie M, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene* 2015; 34: 5617–5625. doi:10.1038/onc.2015.32
- [158] Kim SE, Zhang L, Ma K, et al. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nat Nanotechnol* 2016; 11: 977–985. doi:10.1038/nnano.2016.164
- [159] Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology* 2015; 149: 1204-1225.e12. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.011
- [160] Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 39–53. doi:10.1111/J.1582-4934.2008.00556.X
- [161] Lopes-Ramos CM, Habr-Gama A, Quevedo B de S, et al. Overexpression of miR-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *BMC Med Genomics* 2014 71 2014; 7: 1–14. doi:10.1186/S12920-014-0068-7
- [162] Lo T-F, Tsai W-C, Chen S-T. MicroRNA-21-3p, a Berberine-Induced miRNA, Directly Down-Regulates Human Methionine Adenosyltransferases 2A and 2B and Inhibits Hepatoma Cell Growth. *PLoS One* 2013; 8: 1–11. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0075628
- [163] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66: 683–691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
- [164] Sierra MS, Forman D. Burden of colorectal cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiol* 2016; 44: S74–S81. doi:10.1016/j.canep.2016.03.010
- [165] Miura K, Satoh M, Kinouchi M, et al. The use of natural products in colorectal cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10: 411–426. doi:10.1517/17460441.2015.1018174

- [166] Wellington KW. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. *RSC Adv* 2015; 5: 20309–20338. doi:10.1039/C4RA13547D
- [167] Ferreira VF, Nicoletti CD, Ferreira PG, et al. Strategies for Increasing the Solubility and Bioavailability of Anticancer Compounds: β -Lapachone and Other Naphthoquinones. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 5899–5914. doi:10.2174/1381612822666160611012532
- [168] Bannwitz S, Krane D, Vortherms S, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Lapacho Analogues. 2. Modification of the Basic Naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione, Redox Activation, and Suppression of Human Keratinocyte Hyperproliferation by 8-Hydroxynaphtho[2,3-b]thiophene-4,9-diones. *J Med Chem* 2014; 57: 6226–6239. doi:10.1021/jm500754d
- [169] Valderrama JA, Ríos D, Muccioli GG, et al. In Vitro Inhibition of Hsp90 Protein by Benzothiazoloquinazolinequinones Is Enhanced in The Presence of Ascorbate. A Preliminary In Vivo Antiproliferative Study. *Molecules* 2020; 25. doi:10.3390/molecules25040953
- [170] Gebäck T, Schulz MMP, Koumoutsakos P, et al. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques* 2009; 46: 265–274. doi:10.2144/000113083
- [171] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30: 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- [172] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009; 25: 1105–1111. doi:10.1093/bioinformatics/btp120
- [173] Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 2012; 7: 562–578. doi:10.1038/nprot.2012.016
- [174] Rusinova I, Forster S, Yu S, et al. INTERFEROME v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 2012; 41: D1040–D1046. doi:10.1093/nar/gks1215
- [175] Zheng Y, Zhou J, Tong Y. Gene signatures of drug resistance predict patient survival in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2015; 15: 135–143. doi:10.1038/tpj.2014.45
- [176] Sharma M, Anirudh CR. In silico characterization of residues essential for substrate binding of human cystine transporter, xCT. *J Mol Model* 2019; 25: 336. doi:10.1007/s00894-019-4233-y
- [177] Brookes MJ, Hughes S, Turner FE, et al. Modulation of iron transport proteins in human colorectal carcinogenesis. *Gut* 2006; 55: 1449 LP – 1460. doi:10.1136/gut.2006.094060
- [178] Burada F, Nicoli ER, Ciurea ME, et al. Autophagy in colorectal cancer: An important

switch from physiology to pathology. *World J Gastrointest Oncol* 2015; 7: 271–284. doi:10.4251/wjgo.v7.i11.271

- [179] Basoglu A, Dirkmann S, Zahedi Golpayegani N, et al. Oxadiazole-substituted naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-diones as potent inhibitors of keratinocyte hyperproliferation. Structure–activity relationships of the tricyclic quinone skeleton and the oxadiazole substituent. *Eur J Med Chem* 2017; 134: 119–132. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.084
- [180] Wardakhan WW, Samir EM, El-Arab EE. Synthesis and cytotoxicity of novel thiophene, pyran and pyridine derivatives. *Bull Chem Soc Ethiop* 2018; 32: 259–270. doi:10.4314/bcse.v32i2.7
- [181] Borden EC. Interferons α and β in cancer: therapeutic opportunities from new insights. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18: 219–234. doi:10.1038/s41573-018-0011-2
- [182] Gongora C, Candeil L, Vezzio N, et al. Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 822–832. doi:10.4161/cbt.7.6.5838
- [183] Virag P, Fischer-Fodor E, Perde-Schrepler M, et al. Oxaliplatin induces different cellular and molecular chemoresistance patterns in colorectal cancer cell lines of identical origins. *BMC Genomics* 2013; 14: 480. doi:10.1186/1471-2164-14-480
- [184] Herrera M, Islam ABMMK, Herrera A, et al. Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts from Human Colon Tumors Shows Specific Prognostic Gene Expression Signature. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5914 LP – 5926. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0694
- [185] Tu SP, Sun YW, Cui JT, et al. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer* 2010; 116: 1252–1263. doi:10.1002/cncr.24814
- [186] Ju W-C, Huang G-B, Luo X-Y, et al. X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1 (XAF1) enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to cisplatin. *Med Oncol* 2014; 21: 273. doi:10.1007/s12032-014-0273-4
- [187] Joyce T, Cantarella D, Isella C, et al. A molecular signature for Epithelial to Mesenchymal transition in a human colon cancer cell system is revealed by large-scale microarray analysis. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 569–587. doi:10.1007/s10585-009-9256-9
- [188] Yu W, Lin Z, Pastor DM, et al. Genes Regulated by Nkx2-3 in Sporadic and Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer Cell Lines. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 3171–3180. doi:10.1007/s10620-010-1138-0
- [189] Tang H, Guo Q, Zhang C, et al. Identification of an intermediate signature that marks the initial phases of the colorectal adenoma-carcinoma transition. *Int J Mol Med* 2010; 26: 631–641. doi:10.3892/ijmm_00000508
- [190] Fujino Y, Takeishi S, Nishida K, et al. Downregulation of microRNA-100/microRNA-

125b is associated with lymph node metastasis in early colorectal cancer with submucosal invasion. *Cancer Sci* 2017; 108: 390–397. doi:10.1111/cas.13152

- [191] Sivaprakasam S, Gurav A, Paschall A V, et al. An essential role of Ffar2 (Gpr43) in dietary fibre-mediated promotion of healthy composition of gut microbiota and suppression of intestinal carcinogenesis. *Oncogenesis* 2016; 5: e238–e238. doi:10.1038/oncsis.2016.38
- [192] Tang Y, Chen Y, Jiang H, et al. G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 847–856. doi:10.1002/ijc.25638
- [193] Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, et al. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20: 37–46. doi:10.1007/s12192-014-0523-6
- [194] Luo A, Chen H, Ding F, et al. Small proline-rich repeat protein 3 enhances the sensitivity of esophageal cancer cells in response to DNA damage-induced apoptosis. *Mol Oncol* 2013; 7: 955–967. doi:https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.05.005
- [195] Cho D-H, Jo YK, Roh SA, et al. Upregulation of SPRR3 Promotes Colorectal Tumorigenesis. *Mol Med* 2010; 16: 271–277. doi:10.2119/molmed.2009.00187
- [196] Liu W, Guan M, Su B, et al. Quantitative assessment of AKAP12 promoter methylation in colorectal cancer using methylation-sensitive high resolution melting: Correlation with Duke's stage. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 862–871. doi:10.4161/cbt.9.11.11633
- [197] Liu W, Guan M, Hu T, et al. Re-Expression of AKAP12 Inhibits Progression and Metastasis Potential of Colorectal Carcinoma In Vivo and In Vitro. *PLoS One* 2011; 6: e24015. Im Internet: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024015
- [198] Leclerc D, Lévesque N, Cao Y, et al. Genes with Aberrant Expression in Murine Preneoplastic Intestine Show Epigenetic and Expression Changes in Normal Mucosa of Colon Cancer Patients. *Cancer Prev Res* 2013; 6: 1171 LP – 1181. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0198
- [199] Chou C-K, Fan C-C, Lin P-S, et al. Sciellin mediates mesenchymal-to-epithelial transition in colorectal cancer hepatic metastasis. *Oncotarget* 2016; 7: 25742–25754. doi:10.18632/oncotarget.8264
- [200] Hu L, Chen H-Y, Han T, et al. Downregulation of DHRS9 expression in colorectal cancer tissues and its prognostic significance. *Tumor Biol* 2016; 37: 837–845. doi:10.1007/s13277-015-3880-6
- [201] Lim SR, Gooi B-H, Gam LH. Identification of low abundance proteins in colorectal cancer tissues. *Cancer Biomarkers* 2013; 12: 185–198. doi:10.3233/CBM-130307
- [202] Horst D, Budczies J, Brabletz T, et al. Invasion associated up-regulation of nuclear factor κB target genes in colorectal cancer. *Cancer* 2009; 115: 4946–4958. doi:10.1002/cncr.24564

- [203] Yoneda K, Iida H, Endo H, et al. Identification of Cystatin SN as a novel tumor marker for colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009; 35: 33–40. doi:10.3892/ijo_00000310
- [204] Li J, Cao F, Yin H, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020; 11: 88. doi:10.1038/s41419-020-2298-2
- [205] Konda JD, Olivero M, Musiani D, et al. Heat-shock protein 27 (HSP27, HSPB1) is synthetic lethal to cells with oncogenic activation of MET, EGFR and BRAF. *Mol Oncol* 2017; 11: 599–611. doi:10.1002/1878-0261.12042
- [206] Berthenet K, Bokhari A, Lagrange A, et al. HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation. *Oncogene* 2017; 36: 2328–2336. doi:10.1038/onc.2016.403
- [207] Wang X-Y, Li Y, Masoud AE, et al. Hsp110 over-expression increases the immunogenicity of the murine CT26 colon tumor. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 311–319. doi:10.1007/s00262-002-0287-1
- [208] Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, et al. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4+ T cells and CD8+ T cells. *Cancer Sci* 2005; 96: 695–705. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00093.x
- [209] Shin S-S, Song J-H, Hwang B, et al. HSPA6 augments garlic extract-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; Implication for cell cycle dysregulation, signaling pathway alteration, and transcription factor-associated MMP-9 regulation. *PLoS One* 2017; 12: e0171860. Im Internet: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171860>
- [210] Sun Y, Liu W-Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct* 2015; 35: 600–604. doi:10.3109/10799893.2015.1030412
- [211] Orlando A, Linsalata M, Tutino V, et al. Vitamin K1 Exerts Antiproliferative Effects and Induces Apoptosis in Three Differently Graded Human Colon Cancer Cell Lines. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 296721. doi:10.1155/2015/296721
- [212] Wang H-B, Ma X-Q. Activation of JNK/p38 Pathway is Responsible for α -Methylbutylshikonin Induced Mitochondria-Dependent Apoptosis in SW620 Human Colorectal Cancer Cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2014; 15: 6321–6326. doi:10.7314/APJCP.2014.15.15.6321
- [213] Zhang L-L, Zhan L, Jin Y-D, et al. SIRT2 mediated antitumor effects of shikonin on metastatic colorectal cancer. *Eur J Pharmacol* 2017; 797: 1–8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.008>
- [214] Liu C, Shen G-N, Luo Y-H, et al. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 96: 9–19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.01.004>

LISTADO DE ANEXOS

Material suplementario (Supporting information) del artículo: Active fraction of ground cherry (Physalis angulata L.) calyces attenuates azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced colon carcinogenesis in mice - Fracción activa de los cálices del tomatillo (Physalis angulata L.) disminuye la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano (AOM)/dextran sulfato de sodio (DSS) en ratones

Material suplementario (Supplementary Materials) del artículo: Transcriptome Changes in Colorectal Cancer Cells upon Treatment with Avicequinone B. Cambios transcriptómicos en células de cáncer colorrectal después del tratamiento con Avicequinone B.

Material suplementario (Supplementary information) del artículo: A promising naphthoquinone [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] exerts anti-colorectal cancer activity through ferroptosis and inhibition of MAPK signaling pathway based on RNA sequencing. Una naftoquinona prometedora [8-hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione] ejerce actividad frente al cáncer colorrectal a través de ferroptosis e inhibición de la vía de señalización de las MAPK basándose en resultados del RNA sequencing.

Supporting Information

Active fraction of ground cherry (*Physalis angulata* L.) calyces attenuates azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced colon carcinogenesis in mice.

Yanet C. Ocampo Buendía¹, Daneiva Caro Fuentes¹, David E. Rivera Martínez¹, Luis A. Franco Ospina^{1*}.

¹Biological Evaluation of Promising Substances Group, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Cartagena, Carrera 50 No. 29-11, Cartagena, Colombia.

E-mail addresses: yocampob@unicartagena.edu.co, dcarof@unicartagena.edu.co, driveram@unicartagena.edu.co, lfrancoo@unicartagena.edu.co

***Corresponding author:** Luis Franco, Ph.D.

Biological Evaluation of Promising Substances Group.

Department of Pharmaceutical Sciences.

University of Cartagena.

Zaragocilla Campus. Carrera 50 No. 29-11.

Cartagena-Colombia, 130014.

Phone: 57-5-6699771

Fax: 57-5-6698323

E-mail: lfrancoo@unicartagena.edu.co

1. Materials and Methods

1.1 Preparation of the dichloromethane fraction from *P. angulata* (PADF)

The collected calyces were cleaned, dried at room temperature (25-30°C for 2-3 days) and, grounded into powder using a lab blender (Waring®, New Hartford, CT, USA). Subsequently, the fine powder obtained (114.4 g) was extracted by maceration with ethanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 24-48h at room temperature, filtered (Whatman filter paper, pore size: 11 µM, GE Healthcare, China) and concentrated under reduced pressure at 37±2 °C using a rotary evaporator (Heidolph VV 2000, Heidolph, Kelheim, Germany). To the fractionation, 10.04 g of extract was subjected to liquid-liquid partition with four solvents of different polarities (hexane, dichloromethane, and methanol:water/9:1) (Merck, Darmstadt, Germany). The dichloromethane fraction (PADF) was dried in a rotary evaporator and weighted to calculate the process yield. For the *in vitro* assays, PADF was dissolved in methanol and diluted in McCoy's 5A or EMEM so that the final concentration of the vehicle was lower than 0.1% (v/v). For animal administration, PADF was co-precipitated with polyvinylpyrrolidone (PVP K-30, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in a 1:4 (w/w) ratio using the solvent evaporation technique and before the intraperitoneal injection was dissolved in saline solution.

1.2 Quantification of sucrose esters content

The presence of sucrose esters in PADF was determined spectrophotometrically using the method described by [1]. 1.2 mg of PADF was dissolved in ethanol (0.1 mL) and 0.9 mL of water to obtain a stock solution (1.2 mg/mL). Later, 2.5 mL of anthrone reagent (0.2% in concentrated sulfuric acid) was added slowly to 0.5 mL of the stock solution using an ice bath to avoid overheating and was kept at 70 °C for 30 min. Next, OD₆₂₅ was measured using a microplate reader (Multiscan GO Thermo®). The total

sucrose esters content (%) was calculated using a sucrose standard curve (0.019-1.20 mg/mL) and compared to a reference of a mixture of natural sucrose esters (peruvioses A and B) isolated from *Physalis peruviana* calyces [2].

1.3 Determination of total withanolides content

To determine the total content of this metabolite group, the spectrometric method of [3] was used with some modifications. In brief, 0.1 mL of PADF (10 mg/mL in methanol) was mixed with 0.2 mL of glacial acetic acid and 2.1 mL of color reagent (1.72% ferric chloride hexahydrate and 8% orthophosphoric acid in concentrated sulfuric acid). To avoid overheating, an ice bath was employed. After 5 min, the OD₅₄₀ of the samples was measured using a microplate reader and the concentration of withanolides was calculated using cholesterol as standard (0-2000 mg/mL).

1.4 Determination of total phenolic content

Folín-Ciocalteu modified method previously described by [4] was used to quantify polyphenols in PADF. Folín-Ciocalteu reagent (0.1 M) was mixed to sample fraction, 10 min later a solution of sodium carbonate (7.5%) was added and subsequently incubated for 2 h at room temperature. The OD₇₆₀ was measured using a microplate reader and the values were expressed as mg of gallic acid/g PADF.

1.5 Determination of total flavonoid content

To quantify the total flavonoid content of PADF a modified aluminum trichloride method was employed [4]. PADF was mixed with sodium nitrite (1.5%) incubated for 10 min at room temperature and shaking. After that, an aluminum trichloride (3%) was added and the mixture was stirred for 5 min and, sodium hydroxide (1N) was added and incubated for 10 min. The OD₄₅₀ was measured and the results were expressed as mg of catechin/g PADF.

1.6 Measurement of ROS

HT-29 cells (5×10^4 cells/well) were treated with various concentrations of PADF (0-27.64 $\mu\text{g/mL}$) for 6-24 h. Then, cells were incubated with 10 mM 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 37 °C. The level of intracellular ROS was measured using a fluorescent plate reader (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific Inc.). H_2O_2 (200 μM , 15 min) was used as positive control.

1.7 Toxicological evaluation of PADF

To select the effective doses to be used for *in vivo* studies, a toxicity test was performed using the acute toxic category method, following protocol number 423 of the Organization for Economic Co-operation and Development [31]. In the first experiment, a group of three animals were administered intraperitoneal (IP) with a starting dose of 300 mg/kg, and considering that two animals showed toxic signs, a second experiment was conducted using a dose of 50 mg/kg, replicated in different days and an Irwin test was applying during 48 h for seven days. Data analysis allowed to classify PADF as a category 3 substance (LD_{50} cut-off value=200 mg/kg) [Data not shown].

The safety of PADF was assessed by including a toxicity control group that was administered with PADF (10 and 20 mg/Kg/day) but did not received AOM or DSS. Control (vehicle) and toxicity control (PADF) groups were monitored daily throughout the administration period to detect signs of toxicity or changes in bodyweight. At the end of the experiment, mice were fasted (8-10 h) and anesthetized to obtain blood from the orbital venous to perform a biochemical profile, hematology analysis, micronucleus (MN) assay, and comet assay as previously detailed [5]. Then, a detailed gross postmortem necropsy was performed and the liver, kidneys, spleen, heart, lungs, and ovaries were examined and weighed. Also, bone marrow was extracted to perform the MN assay.

1.8 Ames Mutagenicity Test

Mutagenicity of PADF was assessed by using the commercial Muta-ChromoPlate™ Ames test kit (EBPI Inc., Ontario, Canada). In brief, PADF (27.64 µg/mL) was mixed with *Salmonella typhimurium* (TA100) and incubated in the presence or absence of S9 fraction for 3 days at 37 °C. After incubation, microplates were analyzed visually: yellow, partially yellow or turbid wells were scored as positives while purple wells were scored negative. Sodium azide and 2-aminoanthracene were employed as positive control and DMSO was employed as a negative control.

1.9 Antibodies and Western Blot

Mouse anti-β-catenin (Catalog # 13-8400, monoclonal) and mouse anti-GAPDH (Catalog # MA5-15738, monoclonal) were purchased from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Mouse anti-phospho-JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵, Catalog # sc-6254, monoclonal); mouse anti-phospho-p38 (Tyr¹⁸², Catalog # sc-166182, monoclonal); goat anti-phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, Catalog # sc-16982, polyclonal); mouse anti-JNK (Catalog # sc-137018, monoclonal); mouse anti-p38 (Catalog # sc-271120, monoclonal); rabbit anti-ERK1/2 (Catalog # sc-292838, polyclonal); mouse anti-PCNA (Catalog # sc-25280, monoclonal); goat anti-mouse IgG1-HRP (Catalog # sc-2060); goat anti-mouse IgG2a-HRP (Catalog # sc-2061); goat anti-mouse IgG2b-HRP (Catalog # sc-2062); mouse anti-goat IgG-HRP (Catalog # sc-2354); mouse anti-rabbit IgG-HRP (Catalog # sc-2357) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (USA).

Equal amounts of protein (15 µg) were diluted in 5X sample buffer, denatured at 95 °C for 5 min, separated on 10% SDS-polyacrylamide gel, and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon®-P, Millipore, Billerica, MA, USA). Then, the membranes were stained with Ponceau red (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) to verify the transfer. Subsequently, membranes were washed, blocked with 5% Bovine Albumin Serum (BSA) in Tris-buffered saline containing 1% Tween 20 (TBST), and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C [β -catenin (1:1000), ERK1/2 (1:500), p-ERK1/2 (1:500), GAPDH (1:1000), JNK (1:500), p-JNK (1:500), p38 (1:500), p-p38 (1:500)]. After 3 washings with TBST, the membranes were incubated with proper horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:1000-10.000) for 2 h. Immunoreactive proteins were detected with an enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent Clarity Western (Bio-Rad, USA). Images were acquired with G:BOX Chemi documentation system (Syngene, Frederick, MD) and analyzed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). The expression levels of protein were normalized by that of the corresponding non-phosphorylated protein or GAPDH as indicated in the figures. In some cases, membranes were stripped and reprobed for the detection of GAPDH.

2. Results

2.1 Obtention of PADF and quantification of secondary metabolites

The maceration of plant material gathered produced 15.63 g of total dry extract with a total yield of 13.66%. In the case of PADF, the yield concerning the total extract used to the obtention was 31.37% (3.15 g). In **Table 1S**, are summarized the results of secondary metabolites quantification.

Table 1S. Metabolite content of *Physalis angulata* fraction (PADF)

Sample	Total Sucrose Content	Total Withanolides Content	Total Phenolics Content	Total Flavonoids Content
PADF	393.00±9.89 mg/g	3.70±0.29 mg/g	7.89±0.27 mg/g	No detected
Peruvioses A and B	450.30±9.48 mg/g (Expected: 481.07 mg/g)	---	---	---

2.2 PADF cytotoxicity is time-dependent and not related to ROS induction

As can be seen in **Fig. 1Sa**, PADF induces cytotoxicity as early as 6h, increasing in a time-dependent manner, with a higher effect at 48 h. As the induction of reactive oxygen species (ROS) has been described for cytotoxic compounds and extracts from *P. angulata*, we further tested their production using the DCFH-DA method. Results showed that the cytotoxicity of PADF is not related to the induction of oxidative stress in HT-29 cells (**Fig. 1Sb**).

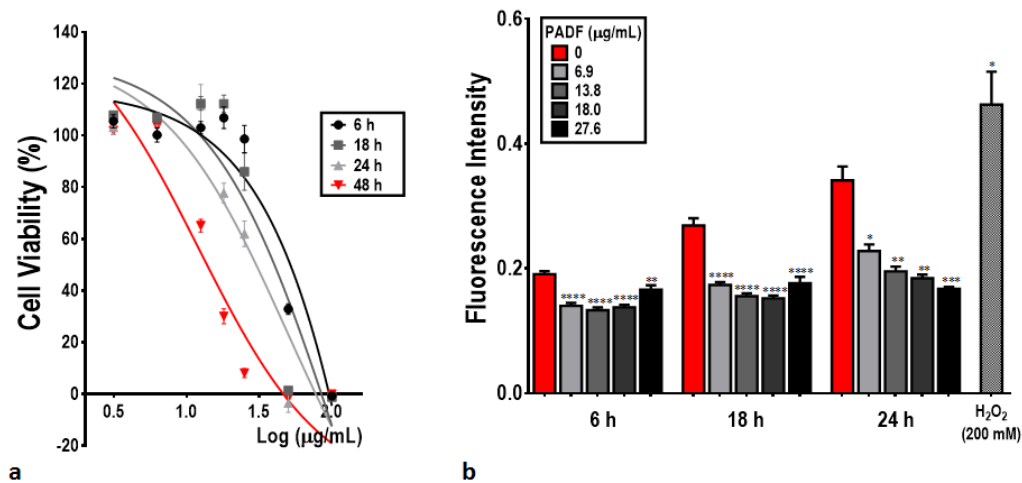


Fig. 1S. Effect of PADF to different exposition times. **(a)** Inhibition of cell growth on HT-29 (MTT assay). **(b)** Level of intracellular ROS of HT-29 cells after the PADF. Results are representative of three independent experiments, and are expressed as the mean \pm SEM (n=10 per group). (*) $P < 0.05$, (**), $P < 0.01$, and (***) $P < 0.0001$ vs. control group.

2.3 Treatment with PADF does not induce toxicity to healthy Balb-c mice.

When sacrificed, all animals treated with PADF (10 and 20 mg/Kg/day) were well-conditioned with normal physical appearance. As shown in **Table 2S**, PADF did not alter the bodyweight of healthy control mice at any dosage level and during the study, no signs of toxicity were identified in the PADF-treated group. The absolute and relative weight of all the studied organs (liver, kidneys, spleen, heart, lungs and, ovaries) were not significantly altered by PADF and the gross necropsy revealed no differences in the appearance and weight of these essential organs.

Table 2S. Effect of PADF on absolute and relative organ weight of Balb-c mice.

Treatment	Organ Weight (Relative Organ Weight)				
	Control	PADF		MMC	MMS
	(Vehicle)	10 mg/Kg	20 mg/Kg	(2 mg/Kg)	(mg/Kg)
Bodyweight (g)	20.94±0.30	21.23±0.48	21.07±0.31	18.92±0.81*	20.38±0.17
Liver	892.83±29.57 (42.54±1.05)	931.95±40.22 (43.79±1.35)	928.62±15.99 (44.1±0.83)	595.64±70.40**** (31.90±4.52***)	850.27±25.94 (41.73±1.30)
Kidneys	257.64±6.58 (11.29±0.22)	251.86±7.41 (11.85±0.17)	286.78±6.09 (13.63±0.64)	187.08±12.26**** (9.93±0.64****)	248.00±4.97 (12.18±0.32)
Spleen	86.21±2.44 (4.11±0.09)	88.46±3.79 (4.16±0.12)	99.23±4.13 (4.72±0.24)	20.82±2.05**** (3.21±0.22****)	65.28±4.29*** (1.12±0.14***)
Heart	133.33±3.81 (5.43±0.20)	113.68±5.24 (5.38±0.27)	125.20±5.95 (5.96±0.33)	84.38±5.83* (4.48±0.32)	119.42±2.99 (5.86±0.16)
Lungs	159.58±5.17 (7.63±0.23)	166.60±9.53 (7.87±0.45)	175.42±5.79 (8.33±0.23)	124.68±4.28* (6.64±0.35)	161.18±6.09 (7.91±0.30)
Ovaries	16.07±1.10 (0.77±0.05)	21.25±2.35 (0.76±0.07)	16.18±1.39 (1.01±0.11)	10.12±1.31* (0.54±0.08)	12.37±1.70 (0.61±0.09)

2.4 Repetitive administration of PADF did not affect hematological parameters

Results from serum hematological analysis are presented in **Table 3S**. Consistently, treatment with PADF (at both doses) did not change significantly most of the studied parameters. Only, reactive lymphocytes or immature lymphocytes were slightly reduced by PADF.

Table 3S. Effect of PADF on hematological parameters of Balb-c mice serum.

<i>Hematology</i>			
Lymphocytes	61.86±2.32	71.63±1.89	57.64±2.53

Reactive Lymphocytes	2.52±0.33	1.33±0.50	1.17±0.34*
Immature Lymphocytes	1.69±0.38	0.11±0.11*	0.50±0.23
Monocytes	5.68±0.55	5.89±0.90	5.25±0.76
Neutrophils	22.99±1.83	15.33±2.09	29.00±2.59
Eosinophils	3.19±0.38	2.00±0.37	2.83±0.44
Basophils	2.84±0.38	1.44±0.56	3.33±0.47

2.5 PADF does not induce genotoxic or mutagenic effects

To further test the safety of PADF, blood and bone marrow samples were used to determine damage to DNA (comet assay) or the formation of MN in erythrocytes (polychromatic-PCE and normochromic-NCE). Results demonstrated that repeated administration of PADF did not increase the frequency of MN-erythrocytes (**Fig. 2Sa-2Sb**) or parameters related to DNA damage such as %Tail DNA and Olive Tail Moment (**Fig. 2Sc**). In addition, PADF did not induce mutagenesis in *S. typhimurium* with or without metabolic activation (**Fig. 2Sd**).

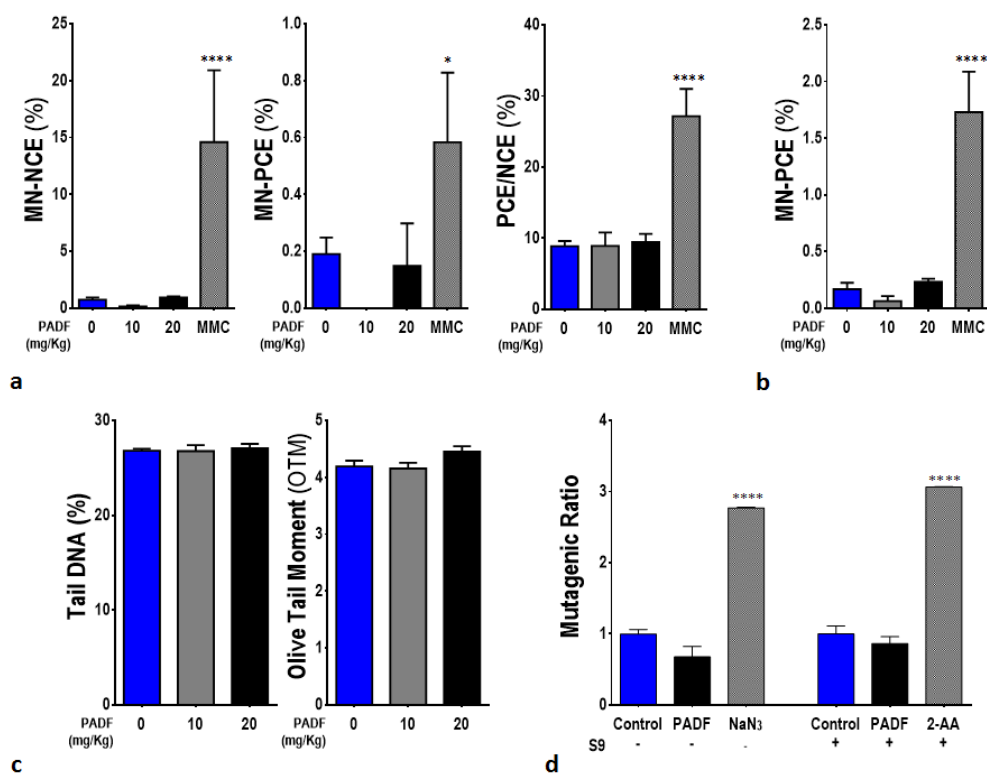


Fig. 2S. Effect of PADF on genotoxic and mutagenic parameters of Balb-c mice. **(a)** and **(b)** Frequency of MN-PCE and MN-NCE, as well as PCE/NCE ratio of micronucleated erythrocytes of peripheral blood and bone marrow; polychromatic erythrocytes (PCE), normochromatic erythrocytes (NCE), and micronucleated PCE (MN-PCE) erythrocytes. **(c)** DNA damage measured by comet assay in peripheral blood cells. **(d)** Mutagenesis in *S. typhimurium* measured by Ames Test. Results are representative of three independent experiments, and are expressed as the mean \pm SEM (n=10 per group). (*) P<0.05, (**) P<0.01, and (****) P<0.0001 vs. control group.

3. References

- [1] Mima H, Kitamori N. Chromatographic analysis of sucrose esters of long chain fatty acids. J Am Oil Chem Soc 1964; 41: 198–200
- [2] Franco LA, Ocampo YC, Gómez HA, et al. Sucrose Esters from Physalis

- peruviana Calyces with Anti-Inflammatory Activity. *Planta Med* 2014; 80: 1605–1614
- [3] Devkar ST, Suryapujary SM, Jagtap SD, et al. Effect of macronutrient deficiency on withanolides content in the roots of *Withania somnifera* and its correlation with molybdenum content. *Pharm Biol* 2015; 53: 518–523
- [4] Rivera DE, Ocampo YC, Castro JP, et al. A screening of plants used in Colombian traditional medicine revealed the anti-inflammatory potential of *Physalis angulata* calyces. *Saudi J Biol Sci* 2019;
- [5] Ocampo YC, Caro DC, Rivera DE, et al. Safety of sucrose esters from *Physalis peruviana* L. in a 28-day repeated-dose study in mice. *Biomed Pharmacother* 2017; 90: 850–862

Supplementary File 1

Supplementary Methods

Cell culture

Cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and maintained with 5% CO₂ at 37 °C in McCoy's 5A medium (HT-29), Dulbecco's Modified Eagle's medium (A549, PC-3, MDA-MB-231, PCS-201-012 and 3T3-L1) or Eagle's Minimal Essential Medium (MRC-5) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Sao Paulo, Brazil) and 1.5 g/L sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), plus low serum growth supplement (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for PCS-201-012.

Cell Viability assay

Briefly, cells were seeded at appropriate densities (10.000-15.000 cells/well) in 96-well plates, incubated for 24 h, and treated with various concentrations of avicequinone B (0-50 µM). After 48 h, the cells were incubated with 0.25 mg/mL MTT (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Four hours later, formazan crystals were dissolved in DMSO and the O.D. at 550 nm was measured using a plate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Inhibition of cell proliferation was expressed as percentage of viable cells in treated samples as compared to vehicle-treated cells, and the 50% inhibitory concentration of cell proliferation (IC₅₀) was calculated by nonlinear regression.

Bioinformatics

Initial bioinformatics analysis was performed at Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia). First, sequencing quality was verified with the raw FastQC reads. Data pre-

processing included removing adapter sequences, trimming low quality ends, and filtering low quality reads at phred quality score Q33 using Trimmomatic.¹ Clean high-quality reads were aligned to a human reference genome (GRCh38.p7) with Tophat.² The expression level for each transcript was calculated as fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments (FPKM) using Cufflinks. Differentially expressed genes (DEGs) were detected with Cuffdiff.³ Genes were considered differentially expressed using the following threshold: $\log_2 |(\text{fold change})| \geq 0.5$, $p\text{-value} \leq 0.001$, and false discovery rate (FDR) $q\text{-value} \leq 0.05$. Finally, the data (significantly impacted pathways, biological processes, molecular function, cellular components, etc.) were analyzed using iPathwayGuide online software (Advaita Corporation, Plymouth, MI, USA). The protein-protein interaction network was analyzed using STRING database⁴ and visualized using Cytoscape.⁵

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

To validate the RNA-sequencing analysis, six DEGs (three up-regulated and three down-regulated) were selected for RT-qPCR. For each sample, 1.0 μg of RNA was employed for cDNA synthesis using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). RT-qPCR analysis was performed with the LightCycler® 96 System (Roche, Mannheim, Germany) using FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Mannheim, Germany) and specific primers (**Supplementary Table 1**, Eurofins Genomics, Huntsville, USA). Gene expression was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) as endogenous housekeeping genes. Duplicate cycle threshold (CT) values were analyzed by the comparative CT ($\Delta\Delta\text{CT}$) method.

Ames Mutagenicity Test

Mutagenicity of avicequinone B was assessed by using the commercial Muta-ChromoPlate™ Ames test kit (EBPI Inc., Ontario, Canada), which follows Ames's test principle and uses *Salmonella typhimurium* (TA100). Avicequinone B was dissolved in DMSO, diluted in growth media to obtain the desired concentration (8.20 μM), mixed with *S. typhimurium* inoculum, and incubated in both presence and absence of S9 fraction, for 3 days at 37 °C in sterile air-tight plastic bag. After incubation, microplates were scored visually: yellow, partially yellow or turbid wells were scored as positives and all purple wells were scored negative. Sodium azide and 2-aminoanthracene were employed as positive control and DMSO was employed as negative control.

Micronucleus assay

3T3-L1 fibroblasts (75.000 cells/well) were seeded and incubated for 24 h, and treated with vehicle (control), avicequinone B (10.7 μM) or mitomycin C (MMC, 0.5 μM) for 30 h. Subsequently, cells were treated with cytochalasin B (4.5 μg/mL) for 18 h and then detached with trypsin, washed and re-suspended with PBS, and finally fixed with ethanol:acetic acid (3:1). Smears were prepared for each sample (20 μL), air dried, stained with Wright's solution (Merck, Darmstadt, Germany), and labeled with a random number to avoid the identification of the treatment group during analysis. Coded slides were analyzed by two independent investigators using a Zeiss Axio Lab.A1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Comet Assay

The comet assay was performed in neutral conditions as described by Trevigen (Trevigen, Gaithersburg, USA) with some modifications. Briefly, 3T3-L1 cells (250.000 cells/well) were treated with vehicle (control) or avicequinone B (10.7 μM) for 48 h. Hydrogen peroxide (150 μM) was employed as positive control. Cells were detached using trypsin, centrifuged, and suspended in cold PBS. The cellular suspension

(10 μ L) was mixed with low-melting point agarose (Trevigen) and spread on CometSlidesTM (Trevigen). After lysis, slides were equilibrated and electrophoresis was performed at 300 mA for 1 h. Finally, DNA was precipitated, and the slides were air dried, fixed in ethanol, and stained with SYBR[®] Safe DNA stain (Invitrogen, Carlsbad, USA). Cells were then visualized using a fluorescent microscope (Axio Lab.A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Representative pictures were recorded at 10X magnification with a Zeiss AxioCAM digital camera (ICc5).

To assess the extent and distribution of DNA damage a qualitative analysis was performed by three blinded scorers that examined 100-1000 randomly selected and non-overlapping comets per well that were classified visually according to tail size ranging from undamaged (class 0) to maximum DNA damage (class 4), as shown in **Figure S1C**.

Supplementary Tables

Table S1. Sequences of Primers used for Real-time qPCR analysis.

Gene Symbol	Gene ID	Official Name	Primer sequences ^a	T _m ^b	Amplicon Size (pb)
AKAP12	9590	A-kinase anchoring protein 12	F: GAGATGGCTACTAAGTCAGCGG R: CAGTGGGTTGTGTTAGCTCTTC	60.3 °C 59.2 °C	124
CYP1A1	1543	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	F: TCCGGGACATCACAGACAGC R: ACCCTGGGGTTCATCACCAA	61.9 °C 61.1 °C	184
EPSTI1	94240	Epithelial stromal interaction 1	F: ACCCGCAATAGAGTGGTGAAC R: GCTATCAAGGTGTATGCACTTGT	60.3 °C 59.1 °C	206
GAPDH	2597	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT R: AACTCTACTTTGCAGAACCTCAC	64.6 °C 64.6 °C	94
HPRT	3251	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	F: ACCAGTCAACAGGGGACATAA R: CTCGTGGGGTCCCTTTTCACC	58.7 °C 61.2 °C	190
IFI44L	10964	Interferon induced protein 44 like	F: ACAGAGCCAAATGATTCCCTATG R: TCGATAAACGACACACCAGTTG	58.6 °C 58.9 °C	124
IFITM1	8519	Interferon induced transmembrane protein 1	F: ACTCAACACTTCCTTCCCAA R: CTCCTGTCCCTAGACTTCACG	59.2 °C 59.8 °C	231
SPRR1B	6699	Small proline rich protein 1B	F: TATTCCTCTTTCACACCAG R: TCCTTGGTTTTGGGGATG	53.8 °C 54.3 °C	155

^a F: Forward (5'→3'); R: Reverse (5'→3'). ^b T_m: Melting temperature.

Table S2. Summary of RNA-seq data including library construction, sequencing and mapping results.

Treatment	Sample	Library Size (Average)	Raw Reads	Clean Reads	Mapped Reads	Mapping Rate	GC%
Vehicle (DMSO)	1	588	12.526.531	11.931.359	10.537.310	88.3%	51
	2	696	14.816.823	14.044.340	12.334.470	87.8%	51
	3	680	14.596.730	13.858.108	12.218.747	88.2%	51
Avicquinone B	4	613	11.080.591	10.536.861	9.320.257	88.46%	50
	5	555	11.732.386	11.119.540	9.807.826	88.20%	50
	6	461	6.825.309	6.465.727	5.530.893	85.54%	50

Table S3. Differentially expressed genes in HT-29 cells treated with avicquinone B in comparison with control (DMSO-treated) counterparts.

Gene	Locus	Value 1 (Control)	Value 2 (Avicquinone B)	LogFC ^a	p value	q value
IFITM1	NC_000011.10:313990-315272	42.5409	2.42756	-4.13127	5.00E-05	0.00377623
LAPTM5	NC_000001.11:30732467-30757840	2.00973	0.201078	-3.32118	0.0001	0.00676519
IFI44L	NC_000001.11:78620381-78646145	7.62704	0.770775	-3.30674	5.00E-05	0.00377623
RSAD2	NC_000002.12:6828553-6898239	3.28666	0.460121	-2.83654	5.00E-05	0.00377623
EPSTI1	NC_000013.11:42886387-42992271	2.74703	0.431894	-2.66912	5.00E-05	0.00377623
TMEM40	NC_000003.12:12733529-12769457	1.25091	0.201787	-2.63207	5.00E-05	0.00377623
TNNC1	NC_000003.12:52451090-52454041	14.2123	2.47664	-2.52069	5.00E-05	0.00377623
GPRC5B	NC_000016.10:19858970-19886045	1.2985	0.232402	-2.48215	5.00E-05	0.00377623
CMPK2	NC_000002.12:6828553-6898239	8.46783	1.59231	-2.41087	5.00E-05	0.00377623
HOPX	NC_000004.12:56647987-56681866	2.20683	0.416391	-2.40596	5.00E-05	0.00377623
OASL	NC_000012.12:121018881-121039242	55.8964	10.7213	-2.38227	5.00E-05	0.00377623
CDX1	NC_000005.10:150166780-150184558	3.06173	0.616582	-2.31198	5.00E-05	0.00377623
XAF1	NC_000017.11:6755410-6775647	3.6127	0.732204	-2.30276	5.00E-05	0.00377623
HEPACAM2	NC_000007.14:93188585-93232297	4.04772	0.821486	-2.3008	5.00E-05	0.00377623
SGCA	NC_000017.11:50157836-50175932	1.10714	0.227868	-2.28057	0.00015	0.00930899
CIDEA	NC_000003.12:9866709-9880254	3.47535	0.716569	-2.27798	5.00E-05	0.00377623
PPP1R14D	NC_000015.10:40815444-40828793	13.2244	2.75664	-2.26222	5.00E-05	0.00377623
PIGR	NC_000001.11:206928521-206946466	7.01245	1.47269	-2.25146	5.00E-05	0.00377623
IFIT1	NC_000010.11:89392545-89406487	18.5847	3.94525	-2.23593	5.00E-05	0.00377623
SEPT4	NC_000017.11:58519836-58692055	1.53396	0.331877	-2.20854	5.00E-05	0.00377623
MX2	NC_000021.9:41304228-41408943	6.10635	1.32814	-2.2009	5.00E-05	0.00377623
CASP1	NC_000011.10:105025507-105035591	1.67499	0.384346	-2.12367	0.00085	0.0351483
LCE1E	NC_000001.11:152786276-152788426	2.82979	0.65109	-2.11977	0.00055	0.0257143
OAS2	NC_000012.12:112978394-	29.0267	6.94227	-2.0639	5.00E-05	0.00377623

	113011723					
IFI44	NC_000001.11:78648553-78664078	52.6196	12.7625	-2.0437	5.00E-05	0.00377623
AGXT	NC_000002.12:240868744-240879119	1.67463	0.410501	-2.02839	0.0011	0.0422045
CD200	NC_000003.12:112332223-112362812	5.58892	1.37295	-2.02529	5.00E-05	0.00377623
IFITM3	NC_000011.10:319672-320914	250.965	62.0231	-2.01661	5.00E-05	0.00377623
ISG15	NC_000001.11:1013466-1014540	594.444	148.447	-2.00159	5.00E-05	0.00377623
REG4	NC_000001.11:119794017-119811580	70.8985	17.7209	-2.0003	5.00E-05	0.00377623
RNASE1	NC_000014.9:20725951-20810034	3.88919	0.980171	-1.98837	5.00E-05	0.00377623
MAPK11	NC_000022.11:50263712-50270393	1.94488	0.492248	-1.98223	5.00E-05	0.00377623
IFI6	NC_000001.11:27666060-27672213	194.867	49.5202	-1.9764	5.00E-05	0.00377623
PLLP	NC_000016.10:57256096-57284672	1.80507	0.459813	-1.97294	0.001	0.039516
NOTUM	NC_000017.11:81952506-81961181	1.7484	0.446327	-1.96986	0.00015	0.00930899
MX1	NC_000021.9:41420328-41459214	33.7418	8.68634	-1.95772	5.00E-05	0.00377623
IFIT2	NC_000010.11:89293472-89316145	14.1052	3.63721	-1.95532	5.00E-05	0.00377623
DDX60	NC_000004.12:168216290-168318807	9.93407	2.586	-1.94166	5.00E-05	0.00377623
PGF	NC_000014.9:74941829-74955764	1.53897	0.405425	-1.92446	0.00035	0.018209
APOE	NC_000019.10:44905748-44909395	6.08789	1.6106	-1.91834	5.00E-05	0.00377623
NTF4	NC_000019.10:49054273-49065076	3.65749	0.979458	-1.9008	0.0001	0.00676519
PAX4	NC_000007.14:127610291-127618192	1.33869	0.364996	-1.87486	0.00125	0.0466054
PTPRO	NC_000012.12:15322256-15598331	7.26995	2.0539	-1.82358	5.00E-05	0.00377623
LCK	NC_000001.11:32251238-32286167	1.17102	0.337414	-1.79517	0.0003	0.0161565
HERC6	NC_000004.12:88378564-88506170	13.2967	3.85989	-1.78443	5.00E-05	0.00377623
IFIT3	NC_000010.11:89327818-89344944	32.7464	9.56394	-1.77566	5.00E-05	0.00377623
GUCA2A	NC_000001.11:42162690-42164724	5.79368	1.69985	-1.76907	0.00115	0.0436419
ANXA13	NC_000008.11:123680793-123766246	66.1225	19.4665	-1.76415	5.00E-05	0.00377623
NEUROG3	NC_000010.11:69571439-69577099	3.04965	0.919591	-1.72958	0.0004	0.020233
GJB6	NC_000013.11:20221961-20232395	1.30194	0.401172	-1.69836	0.00025	0.0139341
UBE2L6	NC_000011.10:57551654-57568330	17.2816	5.33834	-1.69477	5.00E-05	0.00377623
FFAR2	NC_000019.10:35447964-35451767	1.59041	0.495312	-1.68299	0.0005	0.023902
GBP1	NC_000001.11:89034665-89102691	1.9541	0.616409	-1.66455	0.00035	0.018209
SERPINE1	NC_000007.14:101127086-101139266	2.62158	0.830796	-1.65787	5.00E-05	0.00377623
OAS1	NC_000012.12:112906776-112932190	92.4562	29.3328	-1.65625	5.00E-05	0.00377623
KLK12	NC_000019.10:51028953-51035651	6.1343	1.95372	-1.65068	0.0001	0.00676519
IFI27	NC_000014.9:94110732-94116699	651.455	207.715	-1.64906	5.00E-05	0.00377623
NEURL1	NC_000010.11:103479602-103592552	3.07106	0.979787	-1.64819	5.00E-05	0.00377623
RARRES3	NC_000011.10:63536800-63546458	157.788	50.5314	-1.64273	5.00E-05	0.00377623
GPA33	NC_000001.11:167051126-167091553	2.43622	0.789404	-1.62581	5.00E-05	0.00377623

HYAL1	NC_000003.12:50299888-50312951	4.28803	1.41282	-1.60174	0.00015	0.00930899
NEURL3	NC_000002.12:96497642-96508157	2.99216	0.990892	-1.59439	5.00E-05	0.00377623
RHOV	NC_000015.10:40872213-40874289	6.57375	2.17994	-1.59243	5.00E-05	0.00377623
RARRES2	NC_000007.14:150338317-150341685	18.8919	6.34154	-1.57486	5.00E-05	0.00377623
COCH	NC_000014.9:30874495-30890618	2.93872	0.990655	-1.56874	5.00E-05	0.00377623
CLDN2	NC_000023.11:106900062-106930861	62.9028	21.3092	-1.56165	5.00E-05	0.00377623
FAM83C	NC_000020.11:35285250-35292422	1.13674	0.388841	-1.54766	0.00055	0.0257143
CLDN9	NC_000016.10:3012455-3014505	6.01097	2.05831	-1.54614	5.00E-05	0.00377623
ETNK2	NC_000001.11:204131060-204152182	1.2446	0.43096	-1.53005	0.0004	0.020233
GAMT	NC_000019.10:1397025-1401570	6.03035	2.0887	-1.52964	5.00E-05	0.00377623
WWTR1	NC_000003.12:149517234-149724783	1.18082	0.41277	-1.51639	5.00E-05	0.00377623
MAFB	NC_000020.11:40685847-40689240	1.64182	0.576004	-1.51114	0.0001	0.00676519
CARNS1	NC_000011.10:67415677-67425607	2.10177	0.74173	-1.50264	5.00E-05	0.00377623
AIF1L	NC_000009.12:131096475-131123152	2.78618	0.99164	-1.4904	5.00E-05	0.00377623
PSMB9	NC_000006.12:32854160-32859851	10.7217	3.8259	-1.48666	5.00E-05	0.00377623
S100A2	NC_000001.11:153561107-153565830	39.2015	14.097	-1.47552	5.00E-05	0.00377623
RBP4	NC_000010.11:93591835-93601744	12.4303	4.49303	-1.4681	5.00E-05	0.00377623
LGALS2	NC_000022.11:37570245-37580017	47.9498	17.3803	-1.46407	5.00E-05	0.00377623
PALM3	NC_000019.10:14053366-14062137	3.47439	1.26756	-1.4547	5.00E-05	0.00377623
ADH6	NC_000004.12:99088856-99301356	3.89607	1.43769	-1.43827	0.00015	0.00930899
LYPD6B	NC_000002.12:149038466-149215262	2.71453	1.00336	-1.43586	5.00E-05	0.00377623
SLC1A7	NC_000001.11:53087178-53142632	2.82452	1.04592	-1.43324	0.0001	0.00676519
SPHK1	NC_000017.11:76382976-76387860	2.1454	0.796574	-1.42937	0.0003	0.0161565
PDZK1IP1	NC_000001.11:47183588-47190099	67.8236	25.2021	-1.42824	5.00E-05	0.00377623
AQP7	NC_000009.12:33383134-33410302	1.20752	0.44907	-1.42704	0.00035	0.018209
IL1R1	NC_000002.12:102069637-102179874	1.22748	0.460053	-1.41583	0.0002	0.0117098
CX3CL1	NC_000016.10:57372460-57385048	2.39113	0.904247	-1.4029	5.00E-05	0.00377623
USP18	NC_000022.11:18149958-18177397	7.4884	2.85643	-1.39044	5.00E-05	0.00377623
RAET1L	NC_000006.12:150018333-150025596	5.96602	2.2771	-1.38957	5.00E-05	0.00377623
TFF3	NC_000021.9:42311666-42315596	25.0933	9.58104	-1.38904	5.00E-05	0.00377623
CEACAM7	NC_000019.10:41673306-41688277	1.88004	0.720893	-1.3829	0.0006	0.027416
CFB	NC_000006.12:31945943-31952084	10.9144	4.19933	-1.378	5.00E-05	0.00377623
FOLR1	NC_000011.10:72189557-72196323	15.7596	6.0742	-1.37547	5.00E-05	0.00377623
UPK3A	NC_000022.11:45284986-45295874	8.35012	3.22356	-1.37314	0.0003	0.0161565
BLVRA	NC_000007.14:43754840-43839020	6.18426	2.40321	-1.36363	0.00035	0.018209
KRT17	NC_000017.11:41619439-41624630	15.4625	6.07751	-1.34722	5.00E-05	0.00377623
COP2	NC_000017.11:48026166-48048091	4.32374	1.71784	-1.33168	0.0004	0.020233

PRAP1	NC_000010.11:133347339-133352683	34.2362	13.7289	-1.31831	5.00E-05	0.00377623
OAS3	NC_000012.12:112938432-112973251	59.775	24.0309	-1.31465	5.00E-05	0.00377623
TNFAIP8L3	NC_000015.10:51056595-51105276	7.44057	2.99874	-1.31106	5.00E-05	0.00377623
PLEKHA4	NC_000019.10:48837091-48868627	5.57248	2.25644	-1.30427	5.00E-05	0.00377623
CD74	NC_000005.10:150401636-150412936	12.0218	4.87479	-1.30224	5.00E-05	0.00377623
MAP1LC3A	NC_000020.11:34546822-34560345	26.0717	10.5958	-1.299	5.00E-05	0.00377623
SUSD3	NC_000009.12:93058687-93085138	3.74852	1.52781	-1.29486	0.0003	0.0161565
N4BP3	NC_000005.10:178113505-178127034	1.20235	0.4922	-1.28854	0.0001	0.00676519
TSPAN32	NC_000011.10:2296276-2318201	1.97298	0.813535	-1.2781	0.00075	0.0322677
PARP9	NC_000003.12:122525589-122575203	42.15	17.3886	-1.27739	5.00E-05	0.00377623
PRODH	NC_000022.11:18912773-18936553	1.88308	0.778253	-1.27478	0.0012	0.0452256
NES	NC_000001.11:156668762-156677397	1.70873	0.70665	-1.27386	0.00015	0.00930899
SLPI	NC_000020.11:45230820-45290352	10.3812	4.31824	-1.26546	0.0012	0.0452256
RASL11A	NC_000013.11:27270326-27273690	40.1973	16.7707	-1.26115	5.00E-05	0.00377623
SERPINA6	NC_000014.9:94304247-94323351	6.21789	2.5944	-1.26102	0.0001	0.00676519
C1orf115	NC_000001.11:220690285-220699157	2.02657	0.848347	-1.25632	0.0006	0.027416
CDX2	NC_000013.11:27960917-27969368	2.35487	1.00252	-1.23201	0.0004	0.020233
APOL3	NC_000022.11:36140322-36166177	3.36534	1.43891	-1.22578	5.00E-05	0.00377623
SECTM1	NC_000017.11:82321023-82334045	4.26709	1.83601	-1.21668	0.00045	0.0220627
SOWAHA	NC_000005.10:132813323-132816797	2.01462	0.875316	-1.20263	0.00025	0.0139341
SMPD1	NC_000011.10:6390300-6394998	4.85654	2.13595	-1.18505	5.00E-05	0.00377623
IFIH1	NC_000002.12:162267078-162318708	13.2086	5.83259	-1.17927	5.00E-05	0.00377623
UBA7	NC_000003.12:49805204-49813958	4.75	2.10834	-1.17182	5.00E-05	0.00377623
ST6GALNAC1	NC_000017.11:76617768-76643838	3.28893	1.46209	-1.16959	0.00015	0.00930899
LINC00261	NC_000020.11:22560552-22578642	9.96174	4.43652	-1.16697	5.00E-05	0.00377623
DHX58	NC_000017.11:42101403-42112733	9.02519	4.02228	-1.16595	5.00E-05	0.00377623
KCNH2	NC_000007.14:150944955-150978314	8.38604	3.74719	-1.16218	5.00E-05	0.00377623
FAM132B	NC_000002.12:238159007-238168890	2.28682	1.02864	-1.1526	0.0008	0.0338484
SCAMP5	NC_000015.10:74995534-75021495	4.23013	1.90644	-1.14982	0.0001	0.00676519
DDX58	NC_000009.12:32455301-32526324	10.5294	4.7583	-1.1459	5.00E-05	0.00377623
SLC5A9	NC_000001.11:48221112-48248644	1.163	0.526616	-1.14303	0.00135	0.048998
LOXL1	NC_000015.10:73917467-73952141	9.89426	4.49238	-1.13911	5.00E-05	0.00377623
HES6	NC_000002.12:238238266-238240124	36.1551	16.4592	-1.1353	5.00E-05	0.00377623
CIB2	NC_000015.10:78104605-78131976	4.29633	1.97181	-1.12358	0.0007	0.0307735
HES4	NC_000001.11:998961-1001052	13.2588	6.0935	-1.1216	5.00E-05	0.00377623
SERPINE2	NC_000002.12:223975047-224039319	5.12713	2.3618	-1.11826	5.00E-05	0.00377623
LY6E	NC_000008.11:143018484-143022410	326.82	151.639	-1.10786	5.00E-05	0.00377623

FAM131C	NC_000001.11:16057768-16073632	4.00417	1.85902	-1.10696	0.0011	0.0422045
FOXJ1	NC_000017.11:76136332-76240368	7.35402	3.4719	-1.08281	0.00015	0.00930899
MATN2	NC_000008.11:97869020-98036720	3.09348	1.46201	-1.08127	0.00025	0.0139341
SLC7A7	NC_000014.9:22773221-22819811	14.7377	6.99155	-1.07583	5.00E-05	0.00377623
AQP1	NC_000007.14:30911799-30925516	9.45705	4.48919	-1.07494	5.00E-05	0.00377623
AGR3	NC_000007.14:16854710-16881989	46.1377	21.9478	-1.07187	5.00E-05	0.00377623
ULBP2	NC_000006.12:149941937-149949235	10.7436	5.13179	-1.06594	5.00E-05	0.00377623
BST2	NC_000019.10:17402938-17405648	214.436	102.587	-1.06371	5.00E-05	0.00377623
CTSV	NC_000009.12:97029676-97039643	5.50947	2.63952	-1.06164	5.00E-05	0.00377623
VGLL1	NC_000023.11:136532151-136556807	7.4013	3.54918	-1.06029	0.00025	0.0139341
HLA-DMA	NC_000006.12:32948613-32953122	18.1999	8.73976	-1.05826	5.00E-05	0.00377623
CD6	NC_000011.10:60971640-61020377	1.55958	0.756242	-1.04424	0.00135	0.048998
TACSTD2	NC_000001.11:58575422-58577494	31.0952	15.2185	-1.03087	5.00E-05	0.00377623
TMPRSS4	NC_000011.10:118015771-118125505	42.9256	21.029	-1.02946	5.00E-05	0.00377623
SOD3	NC_000004.12:24795462-24800845	8.92351	4.37368	-1.02876	0.00015	0.009309
C2orf54	NC_000002.12:240886047-240896889	12.5282	6.16881	-1.02212	5.00E-05	0.00377623
TUBA4A	NC_000002.12:219245468-219272188	105.916	52.2283	-1.02002	5.00E-05	0.00377623
FBXO44	NC_000001.11:11648360-11663327	6.17793	3.05775	-1.01465	0.00095	0.0380109
MDK	NC_000011.10:46380783-46383837	116.157	57.8586	-1.00547	5.00E-05	0.00377623
HSH2D	NC_000019.10:16134027-16158575	7.62096	3.80238	-1.00307	0.00075	0.0322677
RAMP1	NC_000002.12:237858713-237912117	9.90607	4.95002	-1.00088	0.0006	0.027416
ADGRB2	NC_000001.11:31727104-31764063	2.15238	1.07688	-0.99908	0.0001	0.00676519
TUBB2A	NC_000006.12:3153665-3157549	19.0084	9.56792	-0.990361	5.00E-05	0.00377623
FLT3LG	NC_000019.10:49474171-49487038	5.88006	2.97305	-0.983887	0.0004	0.020233
NME4	NC_000016.10:382240-400754	56.7499	28.7151	-0.982807	5.00E-05	0.00377623
WNK4	NC_000017.11:42779700-42797066	11.1154	5.63265	-0.980673	5.00E-05	0.00377623
SARDH	NC_000009.12:133663073-133739958	1.88408	0.955597	-0.979385	0.0009	0.0363522
PLPPR2	NC_000019.10:11355385-11365698	6.07172	3.11608	-0.962372	5.00E-05	0.00377623
IFI35	NC_000017.11:43006724-43014459	38.3569	19.7291	-0.959157	5.00E-05	0.00377623
SP110	NC_000002.12:230165465-230316571	16.369	8.43213	-0.956997	5.00E-05	0.00377623
PDZK1	NC_000001.11:145607959-145707507	8.78657	4.53874	-0.953009	0.0003	0.0161565
IFIT5	NC_000010.11:89413855-89421506	6.26689	3.24151	-0.951085	5.00E-05	0.00377623
DPEP1	NC_000016.10:89613307-89641540	34.0581	17.6625	-0.947309	5.00E-05	0.00377623
IHH	NC_000002.12:219054419-219060516	16.0267	8.32306	-0.945295	5.00E-05	0.00377623
E2F2	NC_000001.11:23505695-23531266	3.33289	1.74016	-0.937555	0.0002	0.0117098
ZNF358	NC_000019.10:7513879-7534009	12.5802	6.59871	-0.930899	0.0007	0.0307735
NNMT	NC_000011.10:114295812-114312516	19.4155	10.1907	-0.929962	5.00E-05	0.00377623

HLA-F	NC_000006.12:29723339-29749049	10.4424	5.48805	-0.928089	0.00125	0.0466054
HMGCS2	NC_000001.11:119747995-119769125	86.5147	45.5703	-0.924851	5.00E-05	0.00377623
PLSCR1	NC_000003.12:146515177-146544841	93.6336	49.7704	-0.911739	5.00E-05	0.00377623
CDKN1C	NC_000011.10:2883217-2885804	7.77228	4.13937	-0.908927	0.0004	0.020233
CORO1A	NC_000016.10:30183392-30189076	6.55071	3.4904	-0.908258	0.00075	0.0322677
MELTF	NC_000003.12:197001739-197029816	15.3625	8.20154	-0.905443	5.00E-05	0.00377623
CDKN1A	NC_000006.12:36676459-36687339	30.2909	16.19	-0.903783	5.00E-05	0.00377623
APOL1	NC_000022.11:36253070-36267531	73.3644	39.2179	-0.903567	5.00E-05	0.00377623
CLIC3	NC_000009.12:136994607-136997929	53.3757	28.6522	-0.897539	5.00E-05	0.00377623
FAM3D	NC_000003.12:58505135-58706084	33.3341	17.9314	-0.894512	5.00E-05	0.00377623
P3H2	NC_000003.12:189956727-190144846	6.97843	3.75801	-0.892932	5.00E-05	0.00377623
RGS16	NC_000001.11:182598622-182604413	6.50438	3.50553	-0.891781	0.00025	0.0139341
PARM1	NC_000004.12:74933074-75080901	2.21097	1.19219	-0.891065	0.0005	0.023902
CA2	NC_000008.11:85438826-85481492	45.0742	24.3177	-0.890293	5.00E-05	0.00377623
MR1	NC_000001.11:181033378-181061938	1.25083	0.678419	-0.882638	0.0009	0.0363522
STAT1	NC_000002.12:190969035-191014250	71.1877	38.7303	-0.878165	5.00E-05	0.00377623
SELENBP1	NC_000001.11:151364301-151372734	43.1518	23.5697	-0.872491	5.00E-05	0.00377623
OR51E1	NC_000011.10:4643925-4655488	3.39203	1.85904	-0.86759	0.00085	0.0351483
PIK3AP1	NC_000010.11:96587099-96720522	8.43957	4.64407	-0.86178	5.00E-05	0.00377623
NOX1	NC_000023.11:100843323-100874345	25.875	14.2797	-0.857588	5.00E-05	0.00377623
C2orf72	NC_000002.12:231037565-231049714	4.6422	2.5632	-0.856863	0.00015	0.00930899
SAMHD1	NC_000020.11:36873070-36951843	16.6349	9.18573	-0.856746	5.00E-05	0.00377623
HLA-B	NC_000006.12:31353865-31357245	15.8849	8.77853	-0.855603	0.00015	0.00930899
SOSTDC1	NC_000007.14:16461480-16496513	8.23663	4.55802	-0.853646	0.0007	0.0307735
APOL2	NC_000022.11:36226208-36239954	31.3053	17.3461	-0.851799	5.00E-05	0.00377623
IRF7	NC_000011.10:612554-615999	51.6894	28.6415	-0.851761	5.00E-05	0.00377623
HPGD	NC_000004.12:174490176-174541049	11.6522	6.45688	-0.851697	5.00E-05	0.00377623
GGT1	NC_000022.11:24583749-24629005	15.1651	8.40349	-0.851697	5.00E-05	0.00377623
TAP1	NC_000006.12:32840716-32853971	15.0916	8.36626	-0.851093	0.001	0.039516
IL17RE	NC_000003.12:9902085-9916402	12.0954	6.71513	-0.848969	5.00E-05	0.00377623
PARP12	NC_000007.14:140023743-140063721	21.9367	12.1792	-0.848928	5.00E-05	0.00377623
TNFSF10	NC_000003.12:172505507-172523507	23.9149	13.3367	-0.842507	5.00E-05	0.00377623
PXDC1	NC_000006.12:3722601-3752012	19.6238	10.9834	-0.837283	5.00E-05	0.00377623
FAM105A	NC_000005.10:14581781-14616180	17.2444	9.67427	-0.833899	5.00E-05	0.00377623
HSPB1	NC_000007.14:76302557-76304297	377.485	211.792	-0.833773	5.00E-05	0.00377623
CDHR5	NC_000011.10:616564-625067	16.4447	9.25849	-0.828775	5.00E-05	0.00377623
CFH	NC_000001.11:196651877-196747504	16.5425	9.33914	-0.824819	0.0009	0.0363522

CDH3	NC_000016.10:68644819-68727573	4.72372	2.67536	-0.820193	0.0001	0.00676519
MYO7B	NC_000002.12:127535688-127637728	2.67765	1.51946	-0.81741	0.00035	0.018209
NBL1	NC_000001.11:19596976-19658456	44.5972	25.311	-0.817188	0.00065	0.0291442
AQP3	NC_000009.12:33441153-33447633	79.7312	45.2851	-0.816109	5.00E-05	0.00377623
MSLN	NC_000016.10:760745-768865	6.71097	3.82728	-0.810201	0.0006	0.027416
MYBL2	NC_000020.11:43667018-43716496	112.68	64.4847	-0.8052	5.00E-05	0.00377623
GGT6	NC_000017.11:4556926-4560596	15.0588	8.62062	-0.804743	5.00E-05	0.00377623
TMEM238	NC_000019.10:55379243-55384259	39.58	22.7952	-0.796038	0.00015	0.00930899
AOC1	NC_000007.14:150818963-150877309	36.0015	20.7941	-0.791881	5.00E-05	0.00377623
TCN2	NC_000022.11:30607082-30627060	26.2698	15.1893	-0.790352	5.00E-05	0.00377623
VAMP5	NC_000002.12:85584407-85593388	47.0174	27.2739	-0.785671	0.00015	0.00930899
DEGS2	NC_000014.9:100146415-100166886	46.9666	27.3271	-0.781302	5.00E-05	0.00377623
PPP1R1B	NC_000017.11:39626207-39636625	63.6854	37.2082	-0.775343	5.00E-05	0.00377623
TSPAN4	NC_000011.10:842823-867116	11.3134	6.62347	-0.772368	0.0009	0.0363522
NECTIN3	NC_000003.12:111071758-111201444	13.7388	8.0501	-0.771176	0.00035	0.018209
PLIN2	NC_000009.12:19108390-19127606	11.2308	6.60679	-0.765442	0.00025	0.0139341
IL15RA	NC_000010.11:5948896-5978741	6.50805	3.8383	-0.761759	0.0011	0.0422045
KRT13	NC_000017.11:41500980-41505613	13.0508	7.71907	-0.757636	0.0002	0.0117098
IGFBP2	NC_000002.12:216632827-216664436	21.7493	12.8844	-0.75534	0.00055	0.0257143
NINJ1	NC_000009.12:93121488-93134304	33.4916	19.8925	-0.751575	5.00E-05	0.00377623
SESN1	NC_000006.12:108848409-109094505	11.6179	6.90696	-0.750225	0.0001	0.00676519
ASAP3	NC_000001.11:23428562-23484631	3.44949	2.05104	-0.750028	0.00135	0.048998
ZG16B	NC_000016.10:2830171-2832284	24.1402	14.3692	-0.748456	0.00135	0.048998
CCL15	NC_000017.11:35983655-36059131	41.8381	24.9292	-0.746984	0.0001	0.00676519
LGALS4	NC_000019.10:38801670-38813544	1115.86	667.725	-0.740834	5.00E-05	0.00377623
RHOD	NC_000011.10:67056817-67072017	30.7428	18.4164	-0.739256	5.00E-05	0.00377623
IQGAP2	NC_000005.10:76403254-76708132	9.71864	5.82701	-0.737999	5.00E-05	0.00377623
NENF	NC_000001.11:212432886-212446379	37.8002	22.6877	-0.736483	0.0001	0.00676519
DDX60L	NC_000004.12:168356734-168480514	4.2996	2.58439	-0.734378	0.0001	0.00676519
FOXA3	NC_000019.10:45864259-45873797	13.6881	8.25434	-0.729693	0.00035	0.018209
CDH24	NC_000014.9:23047060-23058476	6.56938	3.97123	-0.726172	0.00075	0.0322677
KCNK5	NC_000006.12:39188970-39229475	16.8685	10.2061	-0.7249	5.00E-05	0.00377623
IRF9	NC_000014.9:24161212-24166565	29.1482	17.6628	-0.722695	0.0001	0.00676519
AZGP1	NC_000007.14:99966726-99976112	38.3646	23.3043	-0.719179	5.00E-05	0.00377623
HES1	NC_000003.12:194136141-194138612	37.3534	22.7126	-0.717742	5.00E-05	0.00377623
P2RX4	NC_000012.12:121121217-121234106	9.47461	5.76622	-0.71644	0.00085	0.0351483
CDR2L	NC_000017.11:74987631-75005800	9.92815	6.04242	-0.716399	5.00E-05	0.00377623

HELZ2	NC_000020.11:63558085-63574239	20.7858	12.6626	-0.715026	5.00E-05	0.00377623
CDC42EP5	NC_000019.10:54465024-54473290	27.8949	17.0294	-0.711971	0.00095	0.0380109
HEPH	NC_000023.11:66162525-66267389	15.1066	9.24692	-0.708138	5.00E-05	0.00377623
B2M	NC_000015.10:44711486-44718159	1159.84	711.132	-0.705739	5.00E-05	0.00377623
PARP10	NC_000008.11:143977151-143986471	15.095	9.25955	-0.705053	0.00015	0.00930899
LGALS9	NC_000017.11:27631147-27649560	44.9719	27.735	-0.697316	5.00E-05	0.00377623
PARP14	NC_000003.12:122680725-122730840	36.2684	22.389	-0.695922	5.00E-05	0.00377623
GJB1	NC_000023.11:71215211-71225215	71.0491	43.8628	-0.695818	5.00E-05	0.00377623
PRSS8	NC_000016.10:31131432-31135762	106.917	66.0117	-0.695703	5.00E-05	0.00377623
NRGN	NC_000011.10:124739932-124747206	28.5145	17.6193	-0.694542	0.00035	0.018209
C19orf25	NC_000019.10:1446267-1479552	15.3979	9.53075	-0.692071	0.00025	0.0139341
CLEC3A	NC_000016.10:78022545-78032106	89.462	55.5785	-0.686749	5.00E-05	0.00377623
EBP	NC_000023.11:48521775-48528716	131.17	81.9824	-0.678057	5.00E-05	0.00377623
FXVD3	NC_000019.10:35115820-35124324	110.639	69.4182	-0.672477	0.00045	0.0220627
C19orf66	NC_000019.10:10086118-10106194	14.8958	9.35096	-0.671715	0.0005	0.023902
ASF1B	NC_000019.10:14119508-14136628	77.6034	48.7236	-0.671499	5.00E-05	0.00377623
WNT10A	NC_000002.12:218859822-218893931	10.848	6.81986	-0.669621	0.00115	0.0436419
NEU1	NC_000006.12:31859051-31862932	76.9441	48.4477	-0.667383	5.00E-05	0.00377623
EPN3	NC_000017.11:50532686-50543750	10.7087	6.75049	-0.665715	0.0002	0.0117098
MGAT3	NC_000022.11:39447165-39492194	3.83881	2.42268	-0.664059	0.0011	0.0422045
NR4A1	NC_000012.12:52022831-52059507	11.3219	7.15013	-0.663076	0.0005	0.023902
MUC13	NC_000003.12:124905441-124934751	111.043	70.2736	-0.660059	5.00E-05	0.00377623
C12orf57	NC_000012.12:6943437-6946003	77.633	49.283	-0.655578	0.00025	0.0139341
CRABP2	NC_000001.11:156699605-156712900	532.611	338.947	-0.652023	5.00E-05	0.00377623
FBP1	NC_000009.12:94603132-94640257	96.7572	61.6478	-0.65032	5.00E-05	0.00377623
TGFBI	NC_000005.10:136021543-136063818	25.5914	16.3077	-0.650105	0.00015	0.00930899
NMB	NC_000015.10:84655128-84658611	50.0261	31.9028	-0.648996	0.00045	0.0220627
CRAT	NC_000009.12:129094793-129110791	36.0459	23.0017	-0.648096	5.00E-05	0.00377623
RAB26	NC_000016.10:2148143-2154165	16.509	10.5739	-0.642744	0.00085	0.0351483
WNT11	NC_000011.10:76186325-76210842	19.6365	12.6437	-0.635124	0.0008	0.0338484
RGS2	NC_000001.11:192809038-192812277	39.2711	25.2914	-0.63482	0.00015	0.00930899
BTG2	NC_000001.11:203305535-203309602	27.6493	17.8544	-0.630965	0.0001	0.00676519
PLD1	NC_000003.12:171600403-171810494	12.0577	7.79233	-0.629831	0.00105	0.0410261
DGAT2	NC_000011.10:75768732-75801536	14.7608	9.56564	-0.625836	0.00065	0.0291442
SLC10A3	NC_000023.11:154487305-154490690	42.7257	27.7344	-0.623426	5.00E-05	0.00377623
TPPP3	NC_000016.10:67389806-67393535	110.194	71.5791	-0.62244	5.00E-05	0.00377623
AQP5	NC_000012.12:49950740-49978444	40.009	26.0199	-0.620707	0.0006	0.027416

LGALS3	NC_000014.9:55129216-55145430	78.0749	50.8697	-0.618054	5.00E-05	0.00377623
LAP3	NC_000004.12:17577303-17607967	65.5759	42.7441	-0.617441	5.00E-05	0.00377623
PSME2	NC_000014.9:24143364-24160661	171.49	111.93	-0.615528	0.0009	0.0363522
EFNA1	NC_000001.11:155127872-155134910	27.9665	18.2621	-0.614848	0.00075	0.0322677
BGN	NC_000023.11:153447664-153509554	48.1792	31.4837	-0.613807	0.00045	0.0220627
E2F1	NC_000020.11:33675485-33686404	37.0006	24.1823	-0.613594	0.00025	0.0139341
RAP1GAP	NC_000001.11:21596214-21669444	57.1539	37.3666	-0.613104	5.00E-05	0.00377623
TCEAL9	NC_000023.11:103356451-103358469	51.7985	33.9291	-0.61039	0.00035	0.018209
REEP6	NC_000019.10:1491165-1497925	73.1266	48.1003	-0.60435	0.0001	0.00676519
FUCA1	NC_000001.11:23845076-23868369	44.7016	29.4179	-0.603632	0.0002	0.0117098
ACOT11	NC_000001.11:54548133-54634744	12.3771	8.1502	-0.602766	0.0008	0.0338484
RMI2	NC_000016.10:11249004-11523825	38.3233	25.2384	-0.602601	0.00095	0.0380109
MCAM	NC_000011.10:119308523-119317132	22.3692	14.7325	-0.602509	0.0002	0.0117098
SYT7	NC_000011.10:61513715-61588404	15.0129	9.89807	-0.600983	0.0002	0.0117098
IFITM2	NC_000011.10:308106-309410	110.472	72.8402	-0.600875	0.0002	0.0117098
CCND3	NC_000006.12:41934932-42048894	58.0808	38.5237	-0.592314	0.0001	0.00676519
FCGRT	NC_000019.10:49512278-49526428	112.03	74.3203	-0.592062	0.0002	0.0117098
QPRT	NC_000016.10:29670587-29698699	46.8248	31.0655	-0.591963	0.00025	0.0139341
MAPK3	NC_000016.10:30114104-30123309	43.8144	29.0984	-0.590465	0.0006	0.027416
CALM3	NC_000019.10:46601254-46625118	301.256	200.09	-0.590341	5.00E-05	0.00377623
TUBA1B	NC_000012.12:49127781-49131521	722.269	480.143	-0.589071	0.0003	0.0161565
PXMP2	NC_000012.12:132687605-132704991	51.6483	34.3554	-0.588185	0.00085	0.0351483
TDRD7	NC_000009.12:97412019-97496125	13.8804	9.25517	-0.584716	0.0011	0.0422045
CENPM	NC_000022.11:41927746-41947164	41.9827	27.9988	-0.584431	0.00135	0.048998
KLHDC7A	NC_000001.11:18480929-18485999	8.67603	5.79118	-0.583178	0.0007	0.0307735
CPTP	NC_000001.11:1324755-1328896	25.129	16.7791	-0.582686	0.00035	0.018209
LMO4	NC_000001.11:87328467-87348923	32.3606	21.6108	-0.582488	0.0001	0.00676519
HOXA11-AS	NC_000007.14:27185407-27189293	32.2607	21.5443	-0.582473	0.00105	0.0410261
TRIM21	NC_000011.10:4384896-4393696	22.3151	14.9514	-0.577742	0.0012	0.0452256
ACSF2	NC_000017.11:50426157-50474845	43.4267	29.1343	-0.575861	0.00025	0.0139341
MTSS1L	NC_000016.10:70661203-70686207	12.5524	8.42574	-0.575091	0.0003	0.0161565
NPDC1	NC_000009.12:137039456-137046224	63.4853	42.7274	-0.57126	0.00015	0.00930899
CST3	NC_000020.11:23627896-23638048	294.995	199.255	-0.566076	5.00E-05	0.00377623
ATP1B1	NC_000001.11:169106708-169462221	297.791	201.201	-0.565659	0.00035	0.018209
ATP1B3	NC_000003.12:141876627-141926540	70.0037	47.479	-0.56014	5.00E-05	0.00377623
FEN1	NC_000011.10:61792636-61797244	102.107	69.3154	-0.558831	0.0002	0.0117098
NPC2	NC_000014.9:74479939-74493475	101.245	68.7504	-0.558415	0.00055	0.0257143

HLA-C	NC_000006.12:31268748-31272136	57.051	38.9024	-0.552393	0.00085	0.0351483
ID2	NC_000002.12:8681982-8684453	60.2716	41.1031	-0.55223	0.0005	0.023902
IL22RA1	NC_000001.11:24119770-24143285	27.4222	18.7548	-0.548089	0.0005	0.023902
CD81	NC_000011.10:2328748-2397419	254.252	173.937	-0.547693	0.0004	0.020233
RTN4R	NC_000022.11:20241414-20268293	30.2838	20.7271	-0.547026	0.0013	0.0479098
CYSTM1	NC_000005.10:140175067-140243789	278.611	190.757	-0.546511	5.00E-05	0.00377623
SP6	NC_000017.11:47844907-47876312	23.016	15.7918	-0.543456	0.00035	0.018209
RPS9P2	NC_000022.11:41063995-41064705	178.373	122.41	-0.543176	0.0005	0.023902
S100A14	NC_000001.11:153614254-153616917	146.946	101.1	-0.539508	0.00055	0.0257143
SEPW1	NC_000019.10:47778584-47784682	186.75	129.304	-0.530344	0.00045	0.0220627
WFS1	NC_000004.12:6260367-6308709	41.9984	29.0882	-0.529901	0.0004	0.020233
OAZ2	NC_000015.10:64687573-64703281	71.0834	49.3067	-0.527728	0.00045	0.0220627
FGFR3	NC_000004.12:1793298-1808872	21.453	14.8921	-0.526632	0.0011	0.0422045
ITM2C	NC_000002.12:230864597-230879254	133.684	93.0923	-0.522091	0.00065	0.0291442
PRR15L	NC_000017.11:47951966-47957905	50.8797	35.4701	-0.520488	0.00135	0.048998
AGR2	NC_000007.14:16791810-16805114	587.194	410.12	-0.517793	0.00055	0.0257143
IDI1	NC_000010.11:1018906-1056716	70.2326	49.2373	-0.51239	0.00045	0.0220627
DHCR24	NC_000001.11:54849626-54887248	211.115	148.296	-0.509546	0.0007	0.0307735
GUSB	NC_000007.14:65960683-65982314	55.8062	39.217	-0.508946	0.001	0.039516
VWA1	NC_000001.11:1430156-1442882	56.4819	39.7626	-0.506377	0.0004	0.020233
TMEM54	NC_000001.11:32885964-32901435	323.199	227.583	-0.506033	0.0004	0.020233
SLBP	NC_000004.12:1692730-1712741	57.0828	40.297	-0.502384	0.00085	0.0351483
FTH1P20	NC_000002.12:180692103-180916939	213.278	302.447	0.503945	0.00075	0.0322677
ND1	NC_012920.1:3306-4262	543.642	771.45	0.504914	0.0008	0.0338484
HK2	NC_000002.12:74832654-74893354	14.3402	20.3678	0.506223	0.0011	0.0422045
ATP9A	NC_000020.11:51596774-51768411	35.3742	50.3027	0.50794	0.0003	0.0161565
TEAD1	NC_000011.10:12674421-12944737	13.1709	18.7602	0.510322	0.00025	0.0139341
MED13	NC_000017.11:61942604-62065983	11.2171	15.9787	0.510442	0.0007	0.0307735
BBX	NC_000003.12:107522935-107811329	11.1661	15.9278	0.512419	0.00085	0.0351483
FAM208B	NC_000010.11:5684758-5763740	9.0796	12.9872	0.516385	0.00075	0.0322677
HMGB3	NC_000023.11:150980507-150990775	19.3756	27.726	0.516998	0.00085	0.0351483
FTH1P10	NC_000005.10:17353712-17354631	262.302	375.543	0.517753	0.00015	0.00930899
NTSR1	NC_000020.11:62708769-62762771	36.9341	52.9946	0.52089	0.0009	0.0363522
NF1	NC_000017.11:31094926-31377677	14.7526	21.228	0.524999	0.0004	0.020233
MUC5AC	NC_000011.10:1157952-1201138	3.02008	4.3591	0.529442	0.0011	0.0422045
RICTOR	NC_000005.10:38845857-39074421	4.80669	6.95436	0.532873	0.0008	0.0338484
KIAA0430	NC_000016.10:15434467-15643166	5.68016	8.22526	0.534129	0.0013	0.0479098

SOCS7	NC_000017.11:38351875-38405593	9.3671	13.5713	0.534885	0.0007	0.0307735
CHD9	NC_000016.10:53054990-53327502	3.07985	4.46502	0.535808	0.00105	0.0410261
EGFR	NC_000007.14:55019031-55207338	6.46922	9.4279	0.543345	0.001	0.039516
MAN1A2	NC_000001.11:117367392-117528872	8.24394	12.0274	0.544921	0.00125	0.0466054
TAOK1	NC_000017.11:29390924-29551904	7.01893	10.248	0.546019	0.0003	0.0161565
ABLIM3	NC_000005.10:149141482-149260439	15.4052	22.5027	0.546674	0.00025	0.0139341
DSP	NC_000006.12:7540113-7586717	12.0974	17.6837	0.54772	0.00025	0.0139341
SRRM2	NC_000016.10:2737075-2771412	39.8305	58.2348	0.54801	0.0006	0.027416
ND2	NC_012920.1:4469-5511	469.47	686.78	0.548816	0.00035	0.018209
CAD	NC_000002.12:27217256-27243792	11.9642	17.5029	0.548867	0.00025	0.0139341
HIPK2	NC_000007.14:139561569-139777894	3.68809	5.39885	0.549777	0.00035	0.018209
CDK6	NC_000007.14:92604920-92917187	6.81181	10.0217	0.557011	0.0002	0.0117098
ZNF587	NC_000019.10:57849812-57865123	8.57899	12.627	0.557638	0.00045	0.0220627
FKTN	NC_000009.12:105554034-105655950	3.40622	5.01776	0.558873	0.00075	0.0322677
SLC3A2	NC_000011.10:62856011-62888883	90.8293	133.857	0.559459	5.00E-05	0.00377623
XPOT	NC_000012.12:64404349-64451125	32.537	48.0456	0.562322	0.0001	0.00676519
HIF0	NC_000022.11:37805106-37807436	133.092	197.127	0.5667	0.0002	0.0117098
FAT1	NC_000004.12:186587782-186726915	21.5312	31.9228	0.568163	5.00E-05	0.00377623
MACF1	NC_000001.11:39084166-39487138	7.79624	11.5593	0.568199	0.00075	0.0322677
BNIP2	NC_000015.10:59659145-59689534	8.46531	12.5634	0.569595	0.00035	0.018209
TIPARP	NC_000003.12:156673170-156706770	21.6056	32.1724	0.574423	0.0001	0.00676519
ZFC3H1	NC_000012.12:71609598-71680648	5.12783	7.64805	0.576742	0.00065	0.0291442
MACC1	NC_000007.14:19918980-20217390	3.83359	5.71933	0.577151	0.00055	0.0257143
PPP1R15A	NC_000019.10:48872391-48876062	28.2211	42.1381	0.578353	0.00015	0.00930899
ARID2	NC_000012.12:45729682-45908037	3.50095	5.23995	0.581808	0.0009	0.0363522
TTC14	NC_000003.12:180481502-180679495	8.21289	12.3046	0.583234	0.00135	0.048998
ATRX	NC_000023.11:77504877-77786269	7.5539	11.3205	0.583643	5.00E-05	0.00377623
KIAA1109	NC_000004.12:122152332-122362759	3.99599	5.99238	0.584573	0.0002	0.0117098
HECTD1	NC_000014.9:31100114-31208060	14.3138	21.4726	0.585098	0.00015	0.00930899
ANXA3	NC_000004.12:78551587-78610451	67.327	101.311	0.589534	5.00E-05	0.00377623
EMP1	NC_000012.12:13196667-13216774	9.10301	13.7109	0.590907	0.0009	0.0363522
PRKDC	NC_000008.11:47773107-47960183	18.2133	27.4753	0.593141	5.00E-05	0.00377623
SEL1L	NC_000014.9:81471546-81533864	8.2174	12.4011	0.593716	0.0011	0.0422045
DUSP4	NC_000008.11:29333061-29350750	4.94418	7.46468	0.594348	0.0008	0.0338484
GLTSCR1L	NC_000006.12:42746957-42868560	3.65014	5.52861	0.598964	0.00135	0.048998
PRRC2C	NC_000001.11:171485495-171593511	11.8641	17.9816	0.599924	5.00E-05	0.00377623
PHIP	NC_000006.12:78867485-79078294	3.23961	4.91272	0.6007	0.00105	0.0410261

MYSM1	NC_000001.11:58654738-58700091	3.21197	4.88497	0.60489	0.0007	0.0307735
KIF14	NC_000001.11:200551496-200620791	3.84757	5.86186	0.60741	0.0005	0.023902
SGO2	NC_000002.12:200510197-200584095	4.74619	7.23828	0.608875	0.0008	0.0338484
EP400	NC_000012.12:131949919-132080466	3.67189	5.60927	0.611288	0.00015	0.00930899
LTN1	NC_000021.9:28928143-28929259	3.40292	5.22155	0.617703	0.00075	0.0322677
DST	NC_000006.12:56457986-56954671	4.32121	6.63407	0.61846	0.0001	0.00676519
AREG	NC_000004.12:74445097-74455009	94.8225	145.63	0.619006	5.00E-05	0.00377623
GCLM	NC_000001.11:93885198-93909598	7.56234	11.6265	0.62051	0.0003	0.0161565
ARFGF3	NC_000006.12:138161689-138344663	3.27698	5.0413	0.62143	0.0001	0.00676519
ATXN1	NC_000006.12:16299111-16766883	4.16112	6.41068	0.623504	0.00065	0.0291442
NRIP1	NC_000021.9:14961234-15065903	9.68031	14.9273	0.624829	5.00E-05	0.00377623
CENPF	NC_000001.11:214603180-214664574	13.6763	21.11	0.626247	5.00E-05	0.00377623
SLC7A5	NC_000016.10:87830021-87869499	40.1707	62.0546	0.627393	5.00E-05	0.00377623
FLNA	NC_000023.11:154348528-154374638	47.1481	73.0588	0.63186	5.00E-05	0.00377623
LRP8	NC_000001.11:53226891-53328149	42.7676	66.4028	0.634725	0.00125	0.0466054
ABHD2	NC_000015.10:89088149-89202360	51.525	80.1365	0.637185	5.00E-05	0.00377623
ANXA10	NC_000004.12:168092524-168199047	71.0867	110.713	0.639167	5.00E-05	0.00377623
MIB1	NC_000018.10:21740792-21870957	5.28548	8.24955	0.642282	0.00075	0.0322677
GCLC	NC_000006.12:53497340-53545129	19.5468	30.5676	0.645068	5.00E-05	0.00377623
CEACAM6	NC_000019.10:41755420-41772211	8.10616	12.6793	0.64538	0.0011	0.0422045
ZNF292	NC_000006.12:87155550-87264172	2.45173	3.84993	0.651032	0.0003	0.0161565
CAPN8	NC_000001.11:223541608-223665734	17.2319	27.0913	0.652742	0.0002	0.0117098
BTAF1	NC_000010.11:91923768-92030998	5.17844	8.1431	0.653061	0.00015	0.00930899
ZBTB41	NC_000001.11:197153681-197200542	2.40056	3.77611	0.653532	0.00045	0.0220627
AKAP11	NC_000013.11:42271469-42323267	6.15062	9.6827	0.654678	5.00E-05	0.00377623
TBC1D5	NC_000003.12:17157161-17742739	3.67817	5.80004	0.657074	0.00055	0.0257143
RBM33	NC_000007.14:155644493-155781485	6.72548	10.6139	0.658242	5.00E-05	0.00377623
FGF19	NC_000011.10:69698237-69704338	29.6987	46.8797	0.658564	5.00E-05	0.00377623
ADAM19	NC_000005.10:157477303-157575823	3.73145	5.90408	0.661979	0.00025	0.0139341
QSER1	NC_000011.10:32892825-33015362	7.86245	12.4662	0.664972	5.00E-05	0.00377623
ANKRD12	NC_000018.10:9136752-9285985	3.2695	5.19173	0.667147	0.00045	0.0220627
VPS13D	NC_000001.11:12230038-12512047	1.86621	2.96495	0.667898	5.00E-05	0.00377623
CEP350	NC_000001.11:179954772-180114880	2.51543	4.00228	0.670016	5.00E-05	0.00377623
BRCA2	NC_000013.11:32315479-32399672	2.37144	3.77492	0.67068	0.0003	0.0161565
ABCG1	NC_000021.9:42199688-42304389	6.89775	10.9897	0.671958	0.0009	0.0363522
DEPDC1	NC_000001.11:68474151-68538627	6.44705	10.3004	0.675994	0.00015	0.00930899
ZCCHC11	NC_000001.11:52423274-52553463	3.84783	6.1547	0.677643	0.0003	0.0161565

DGKH	NC_000013.11:42040035-42256584	3.02129	4.83456	0.678219	0.0001	0.00676519
MTX3	NC_000005.10:79976715-79991267	1.87527	3.00513	0.680327	0.00075	0.0322677
BDP1	NC_000005.10:71455614-71578288	3.24263	5.20582	0.682962	5.00E-05	0.00377623
SMG1	NC_000016.10:18804852-18937762	7.03782	11.3111	0.684539	5.00E-05	0.00377623
VPS13A	NC_000009.12:77176755-77421537	3.4499	5.57324	0.691959	5.00E-05	0.00377623
ANAPC1	NC_000002.12:111766146-111884196	7.34977	11.9076	0.696118	0.00095	0.0380109
SLC38A1	NC_000012.12:46183054-46278613	31.7006	51.5983	0.702813	5.00E-05	0.00377623
CYP1B1	NC_000002.12:37920788-38076181	7.60455	12.4111	0.706699	5.00E-05	0.00377623
UVSSA	NC_000004.12:1345661-1388049	4.0506	6.63224	0.711361	0.0008	0.0338484
UTP20	NC_000012.12:101280126-101386619	2.66149	4.41517	0.730231	0.0001	0.00676519
CASC5	NC_000015.10:40594011-40664342	4.25433	7.05866	0.730461	5.00E-05	0.00377623
TTBK2	NC_000015.10:42738973-42920995	1.77098	2.94894	0.735647	0.0002	0.0117098
BRWD3	NC_000023.11:80669487-80809736	3.3231	5.5459	0.738892	0.0013	0.0479098
LOC105369370	NC_000011.10:69366824-69372512	2.57017	4.30615	0.744538	0.00025	0.0139341
CALB2	NC_000016.10:71358712-71392129	48.0807	80.7608	0.748198	5.00E-05	0.00377623
DCBLD2	NC_000003.12:98795969-98901689	43.0967	72.692	0.75422	5.00E-05	0.00377623
PHLDA1	NC_000012.12:76025446-76031776	21.4561	36.3713	0.761408	5.00E-05	0.00377623
LPP	NC_000003.12:188151205-188890671	3.1205	5.37336	0.784046	5.00E-05	0.00377623
ATF3	NC_000001.11:212565333-212620777	7.15249	12.3503	0.788026	5.00E-05	0.00377623
ZKSCAN8	NC_000006.12:28141643-28159472	2.65664	4.59228	0.789611	5.00E-05	0.00377623
ZNF532	NC_000018.10:58862599-58986480	4.00508	6.99848	0.805211	5.00E-05	0.00377623
SNX29	NC_000016.10:11976733-12574289	1.45527	2.54791	0.808025	0.0003	0.0161565
TMTC2	NC_000012.12:82686951-83134868	6.91152	12.1585	0.814891	5.00E-05	0.00377623
CENPE	NC_000004.12:103105805-103198409	3.82639	6.764	0.821893	5.00E-05	0.00377623
GAS2L3	NC_000012.12:100573660-100628288	2.82832	5.06214	0.839802	0.00085	0.0351483
CREB3L2	NC_000007.14:137874978-138002101	3.01024	5.43189	0.851575	0.00015	0.00930899
REL	NC_000002.12:60881494-60928171	1.31429	2.37967	0.85648	0.0002	0.0117098
CREB5	NC_000007.14:28299320-28825894	0.854062	1.55096	0.860748	0.00135	0.048998
LGR6	NC_000001.11:202193989-202319761	1.62151	2.97004	0.873147	0.001	0.039516
SORBS1	NC_000010.11:95311772-95561420	0.737856	1.36492	0.887403	5.00E-05	0.00377623
PSD3	NC_000008.11:18527302-19086909	1.47484	2.73411	0.890518	5.00E-05	0.00377623
ASPM	NC_000001.11:197084126-197146694	6.49836	12.1561	0.903533	5.00E-05	0.00377623
NEAT1	NC_000011.10:65422797-65445540	49.8066	94.0846	0.917622	5.00E-05	0.00377623
CLIP4	NC_000002.12:29097675-29183813	1.12211	2.1577	0.943287	0.00065	0.0291442
XIST	NC_000023.11:73792204-73852753	4.01727	7.8923	0.97423	5.00E-05	0.00377623
FAM129A	NC_000001.11:184791024-184975132	2.2605	4.45162	0.977689	5.00E-05	0.00377623
EREG	NC_000004.12:74365142-74388760	14.0173	27.6727	0.981257	5.00E-05	0.00377623

ADGRF1	NC_000006.12:46997702-47042363	5.7863	11.4912	0.989821	5.00E-05	0.00377623
IGSF9B	NC_000011.10:133908563-133956960	0.750953	1.50213	1.00021	0.0011	0.0422045
PSAT1	NC_000009.12:78297074-78330093	33.8886	70.913	1.06525	5.00E-05	0.00377623
TTLL7	NC_000001.11:83861110-83999340	0.730706	1.53107	1.06718	0.0012	0.0452256
TTC6	NC_000014.9:37595198-37842628	0.602631	1.26312	1.06764	0.0007	0.0307735
ABCA1	NC_000009.12:104781001-104939096	0.59561	1.27292	1.0957	5.00E-05	0.00377623
LOC400706	NC_000019.10:46057677-46077629	1.72067	3.68172	1.09741	0.0001	0.00676519
CHAC1	NC_000015.10:40942134-40956519	4.4221	9.46476	1.09783	5.00E-05	0.00377623
CEMIP	NC_000015.10:80779342-80989878	13.475	29.0212	1.10683	0.00055	0.0257143
CTH	NC_000001.11:70411217-70441949	2.07747	4.54347	1.12896	0.0002	0.0117098
PTPRM	NC_000018.10:7567315-8406861	0.75628	1.71462	1.18089	5.00E-05	0.00377623
SLCO5A1	NC_000008.11:69667045-69837829	0.505013	1.17902	1.22319	0.00085	0.0351483
PGM5	NC_000009.12:68355163-68531061	1.17393	2.76146	1.23409	0.0004	0.020233
TNC	NC_000009.12:115019574-115118257	0.940044	2.27738	1.27658	5.00E-05	0.00377623
SERPINA3	NC_000014.9:94612376-94624053	1.57644	4.09036	1.37556	0.0002	0.0117098
LRRN4	NC_000020.11:6040545-6054080	0.530669	1.39522	1.39461	0.00075	0.0322677
SLC6A9	NC_000001.11:43991246-44040680	0.799768	2.18878	1.45248	0.00115	0.0436419
ASNS	NC_000007.14:97852116-97872542	26.8663	89.2487	1.73203	5.00E-05	0.00377623
SCEL	NC_000013.11:77535673-77645263	2.62774	8.72945	1.73207	5.00E-05	0.00377623
CYP1A1	NC_000015.10:74719541-74725610	0.523368	1.76512	1.75387	5.00E-05	0.00377623
SLC7A11	NC_000004.12:138025237-138242418	5.73686	19.9331	1.79684	5.00E-05	0.00377623
AKAP12	NC_000006.12:151239814-151358559	1.51284	5.72766	1.92069	5.00E-05	0.00377623
SPRR1B	NC_000001.11:153031202-153032900	1.87231	8.19831	2.13051	5.00E-05	0.00377623

^aLogFC: Log₂ of Fold Change

Table S4. Top ten differentially expressed genes (Down-regulated) by Avicquinone B

Gene Symbol	Description	Function	Association with CRC	LogFC	q value
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1	IFN-induced antiviral protein	↑ Expression in CRC tissue is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis.	-4.131	0.004
			↑ Proliferation and invasiveness of CRC cells (SW480 and DLD-1) with stable/ectopic over-expression of IFITM1.		
			↓ Migration/invasion ability of CRC cells (HT-29, LoVo, and DLD-1) with transient/stable knockdown of IFITM1. ⁶⁻⁹		
LAPTM5	Lysosomal-associated transmembrane protein 5	May have a special functional role during embryogenesis and in adult hematopoietic cells.	Predicted target of hsa-miR-150, hsa-miR-16 and hsa-miR-28, miRNAs down-regulated in CRC tissue. ¹⁰	-3.321	0.007
IFI44L	Interferon-induced protein 44-like	Exhibits a low antiviral activity against hepatitis C virus.	↑ Expression in KRAS-mutated CRC cell lines and patient-derived organoid culture.	-3.307	0.004
			↑ Expression in HT-29 cells resistant to Oxaliplatin. ^{11,12}		
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2	Interferon-inducible iron-sulfur (4FE-4S) cluster-binding antiviral protein.	↑ Expression in CRC samples when compared to colorectal adenomas. ¹³	-2.836	0.004
EPSTI1	Epithelial-stromal interaction protein 1	-----	↑ Expression in metastatic CRC cell lines compared to primary CRC cells.	-2.669	0.004
			↑ Expression in CRC cell lines with silenced expression of Nkx2-3, a transcription factor down regulated in CRC. ^{14,15}		
TMEM40	Transmembrane protein 40	-----	-----	-2.632	0.004
TNNC1	Troponin C (TN-C)	Troponin is the central regulatory protein of striated muscle contraction.	↑ Expression in CRC cells (SW480) treated with the ligand of CXCR4 and CXCR7, chemokines receptors increased with tumor stage and size in CRC. ¹⁶	-2.521	0.004
GPRC5B	G-protein coupled receptor family C group 5 member B	Unknown	Targeted by hsa-miR-99b-5p, a miRNA down-regulated in CRC tissue. ¹⁷	-2.482	0.004
CMPK2	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial (cytidine/uridine monophosphate kinase 2)	May participate in dUTP and dCTP synthesis in mitochondria.	↑ mRNA expression is correlated to a higher risk score in stages I-III CRC, DNA aneuploidy, and neoplastic progression. ^{18,19}	-2.411	0.004
HOPX	Homeodomain-only protein	Atypical homeodomain protein which is required to modulate cardiac growth and development.	Colon stem cell marker. ↓ Expression in CRC tissue, mainly in an epigenetic manner, which is associated with increased progression and metastasis. Forced expression of HOPX suppressed proliferation and invasion of CRC cells (HCT116 and DLD1). ²⁰	-2.406	0.004

Table S5. Top ten differentially expressed genes (Up-regulated) by Avicquinone B

Gene Symbol	Description	Function	Association with CRC	LogFC	q value
SPRR1B	Cornifin-B	Cross-linked envelope protein of keratinocytes.	↑ mRNA expression in HT-29 cells with knockdown expression of PHGR1, a possible protein marker of CRC development and metastasis. ²¹	2.131	0.004
AKAP12	A-kinase anchor protein 12 (Gravin)	Anchoring protein that mediates the subcellular compartmentation of protein kinase A and C.	↓ mRNA expression or methylation of gene promoter in CRC tissue. ► Tumor suppressor gene in CRC. Represents a potential molecular biomarker for predicting CRC malignancy. ► Induced re-expression of AKAP12 promoted apoptosis, reduced colony formation and migration of LoVo cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . ²²⁻²⁴	1.921	0.004
SLC7A11	Cystine/glutamate transporter (xCT)	High affinity exchange of anionic aminoacids.	↓ Protein expression in metastatic CRC cells. ²⁵	1.797	0.004
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1	Heme-thiolate monooxygenase that oxidizes a variety of compounds, including xenobiotics.	► Polymorphisms in CYP1A1 gene are associated with increased risk of CRC development. ► Key metabolizing enzyme of polycyclic aromatic hydrocarbons (i.e. benzo[a]pyrene) which are considered important carcinogens. ²⁶⁻²⁸	1.754	0.004
SCEL	Sciellin	May function in the assembly or regulation of proteins in the cornified envelope.	↓ Expression in specimens from CRC patients with metastasis. ↓ Expression in CRC metastatic cell lines promoted migration and invasion, while overexpression had the opposite effect. ²⁹	1.732	0.004
ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	Synthesizes de novo asparagine from aspartate and glutamine	↑ mRNA expression in CRC cells (i.e. SW620 and HT-29) treated with anti-carcinogenic compounds. ↑ Expression in KRAS-mutated CRC cells/tissue, through the PI3K-AKT-mTOR pathway, is an important metabolic adaptation to support growth and survival. Silencing of ASNS diminished the proliferation of KRAS-mutant CRC cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . ³⁰⁻³²	1.732	0.004
SLC6A9	Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1	Terminates the action of glycine by its high affinity sodium-dependent reuptake into presynaptic terminals.	↑ mRNA expression when CRC cells (i.e. HCT-116 or RKO) were treated with protopanaxadiol, a cytotoxic metabolite from <i>P. quinquefolius</i> L., or Zinc during hypoxia. ^{33,34}	1.452	0.044
LRRN4	Leucine-rich repeat neuronal protein 4	May play an important role in hippocampus-dependent long-lasting memory.	Identified as a low abundance protein in CRC tissues. ³⁵	1.395	0.032
SERPINA3	Alpha-1-antichymotrypsin (Serpina3)	Serine protease inhibitor, specific against neutrophil cathepsin G, mast cell chymase, and pancreatic chymotrypsin.	↓ Expression in CRC samples (affected tissue, SW620 metastatic cells, HT-29 malignant colonospheres) when compared to paired normal samples. ↑ Expression in disseminated than localized CRC. ↑ Levels in serum/plasma levels of CRC patients when compared to patients with polyps or healthy. ³⁶⁻³⁸	1.376	0.012
TNC	Tenascin	Extracellular matrix protein that, in tumors, stimulates angiogenesis	↑ Expression in CRC tissue (mainly by cancer associated fibroblasts) that promote survival, proliferation, and invasiveness of CRC cells by induction of angiogenesis and metastasis, particularly to the liver. ^{39,40}	1.277	0.004

Supplementary Figures

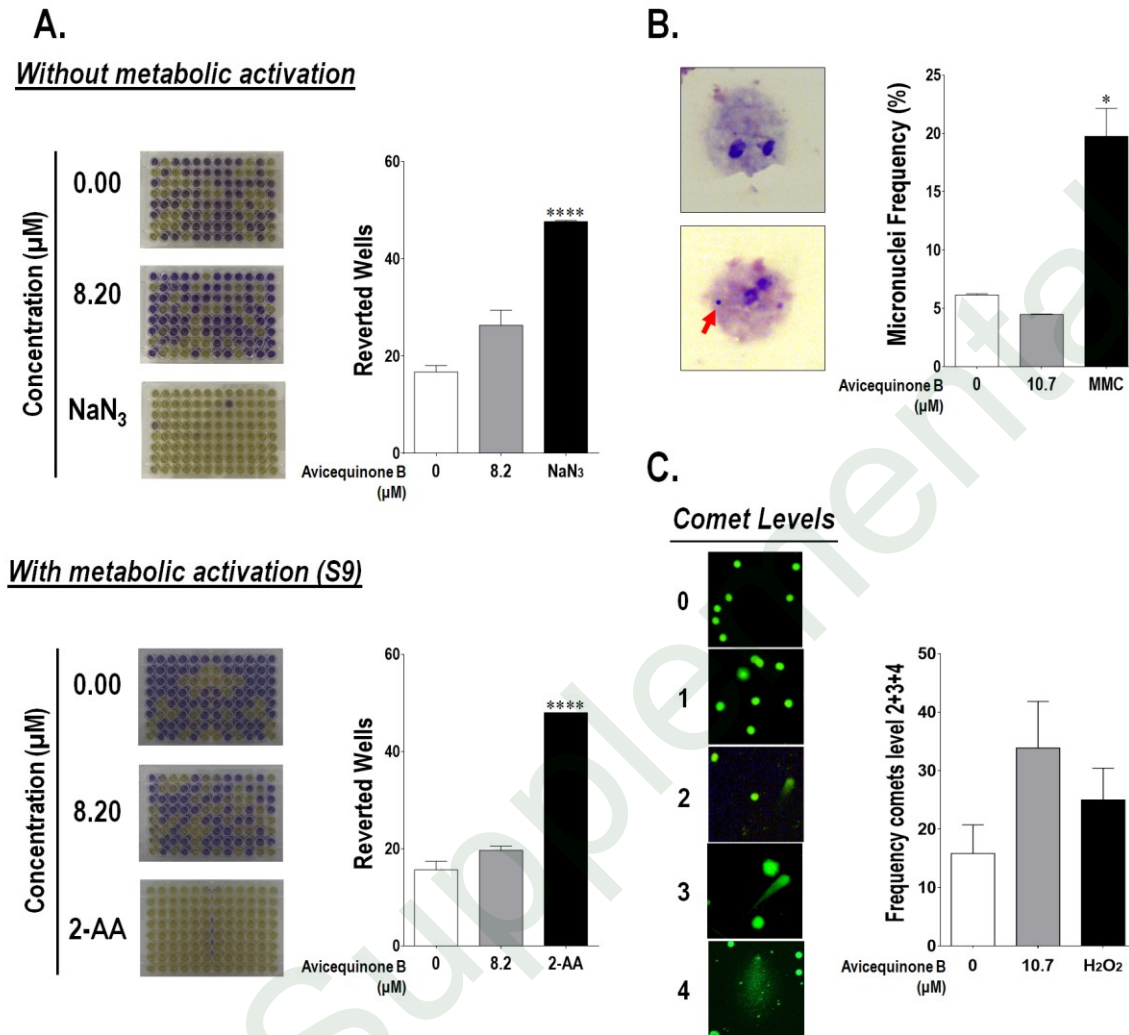


Figure S1. Avicquinone B did not induce mutagenic or genotoxic effects *in vitro*. (A) Ames test was performed using *Salmonella typhimurium* (TA100) treated with vehicle (DMSO, control), avicquinone B (8.20 μM), sodium azide (NaN_3), or 2-aminoanthracene (2-AA), with and without S9 metabolic activation. Mutagenic effect was scored visually; yellow wells were counted as positive whereas purple wells counted as negative. The frequency of reverted wells is plotted in a bar graph. Results are representative of two independent experiments, and are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=4-11$ per group). (****) $p<0.0001$ vs. control group. (B) Micronucleus assay was performed using 3T3-L1 fibroblasts treated with vehicle (DMSO, control), avicquinone B (10.7 μM) or mitomycin (MMC, 0.5 μM) for 30 h, before blocking the cytokinesis with cytochalasin. Representative pictures of a fibroblast Vs. micronucleated fibroblasts are shown; (Wright's Stain; 100X). The frequency of micronucleated fibroblasts is plotted in a bar graph. Results are representative of two independent experiments, and are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=5-10$ per group). (*) $p<0.05$ vs. control group. (C) Comet assay was performed using 3T3-L1 fibroblasts treated with vehicle (DMSO, control), avicquinone B (10.7 μM) or hydrogen peroxide (150 μM) before neutral DNA-electrophoresis. Representative pictures of comet tails for each scored population assigned by three blinded investigators are shown (SYBER green stain; 10X). The frequency of comets with medium to complete DNA-damage was plotted in a bar graph. Results are representative of two independent experiments, and are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=4$ per group).

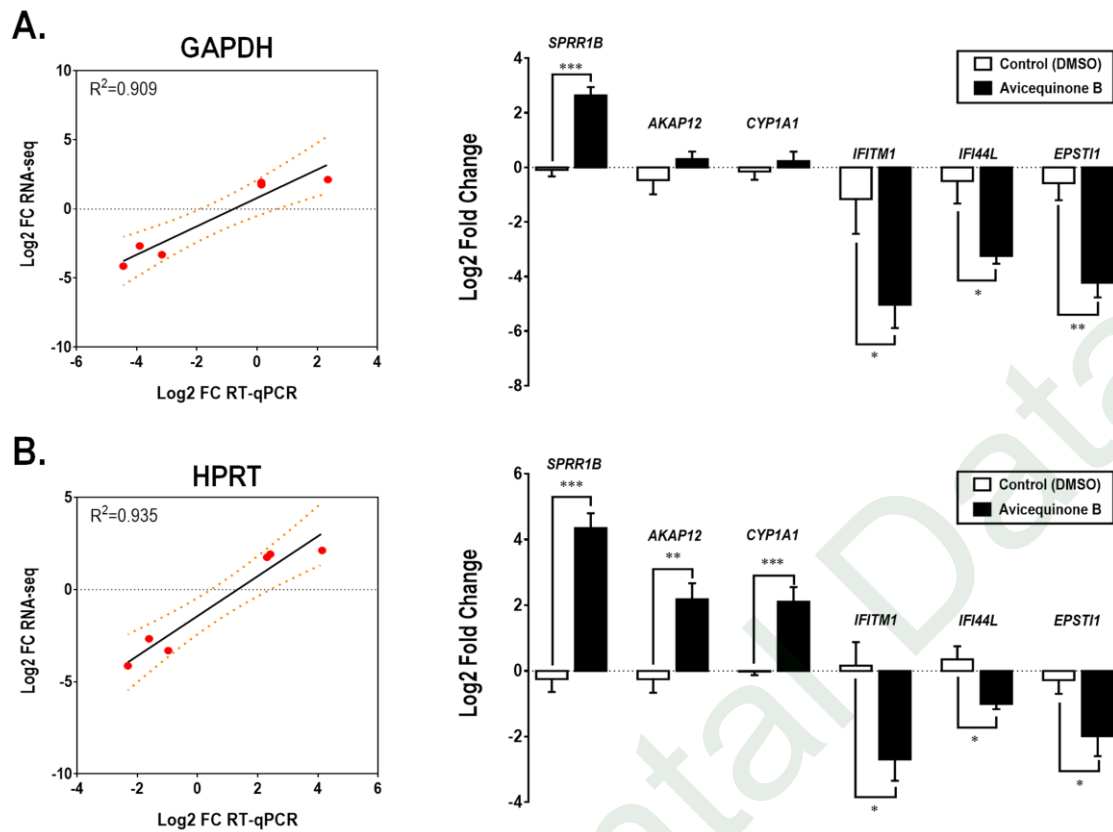


Figure S2. RT-qPCR validation of RNA-seq results. Six genes were selected to confirm the differential expression using the same samples used for RNA-seq ($n=3$) with RT-qPCR. Results were plotted as the correlation and linear regression analysis between RNA-seq and RT-qPCR data (Log₂FC-fold change), in addition to the detailed results from the RT-qPCR analysis of selected genes when using (A) GAPDH or (B) HPRT as endogenous housekeeping genes. Data are expressed as mean \pm S.E.M ($n=3-6$ per group), * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, as calculated by unpaired t-test with Welch's correction when required.

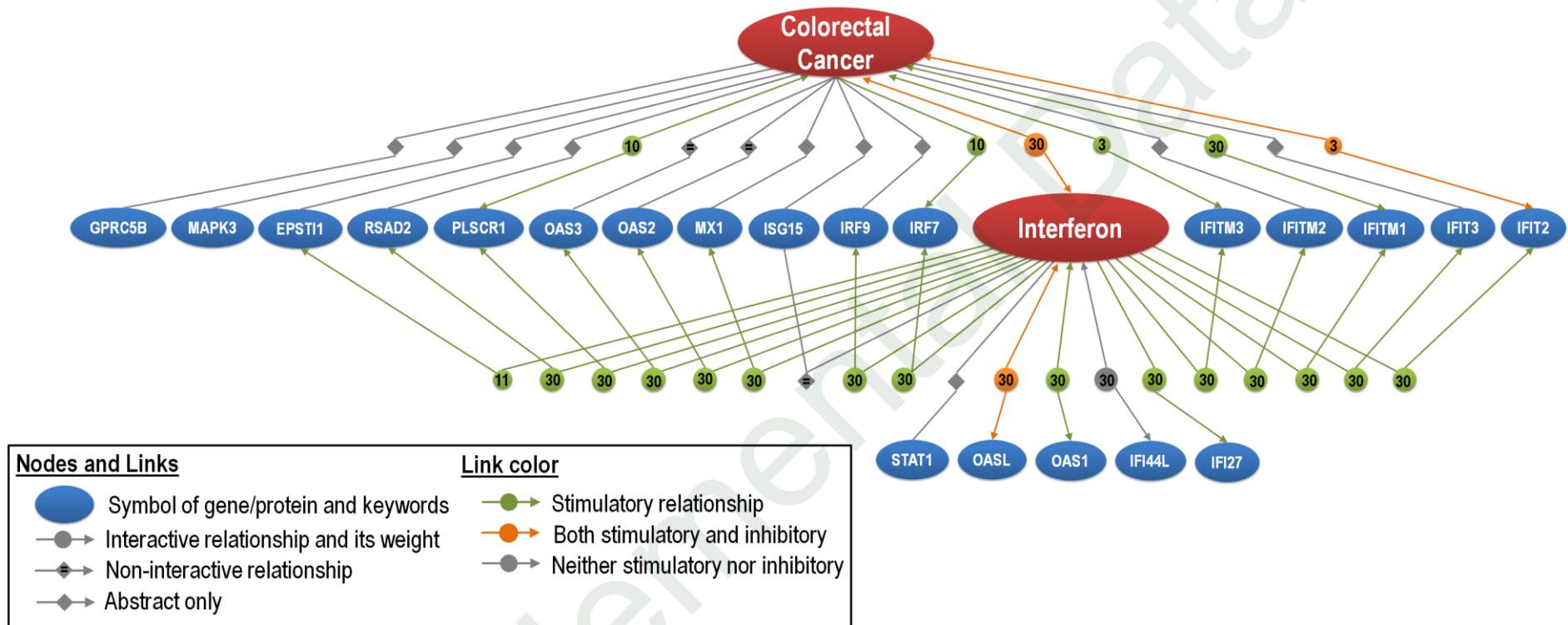


Figure S3. Colorectal cancer, interferon, and interferon regulated genes (IRGs) are strongly related. Text-mining was applied using Chillibot (<http://www.chilibot.net/>) searching for interactions between differentially expressed IRGs (CMPK2, EPSTI1, GPRC5B, IFI27, IFI44L, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM2, IFITM3, IRF7, IRF9, ISG15, MAPK3, MAPK11, MAPK12, MX1, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLSR1, RSAD2, STAT1, TNNC1), and the root keywords “Colorectal cancer” and “Interferon”. Updated December 07, 2018.

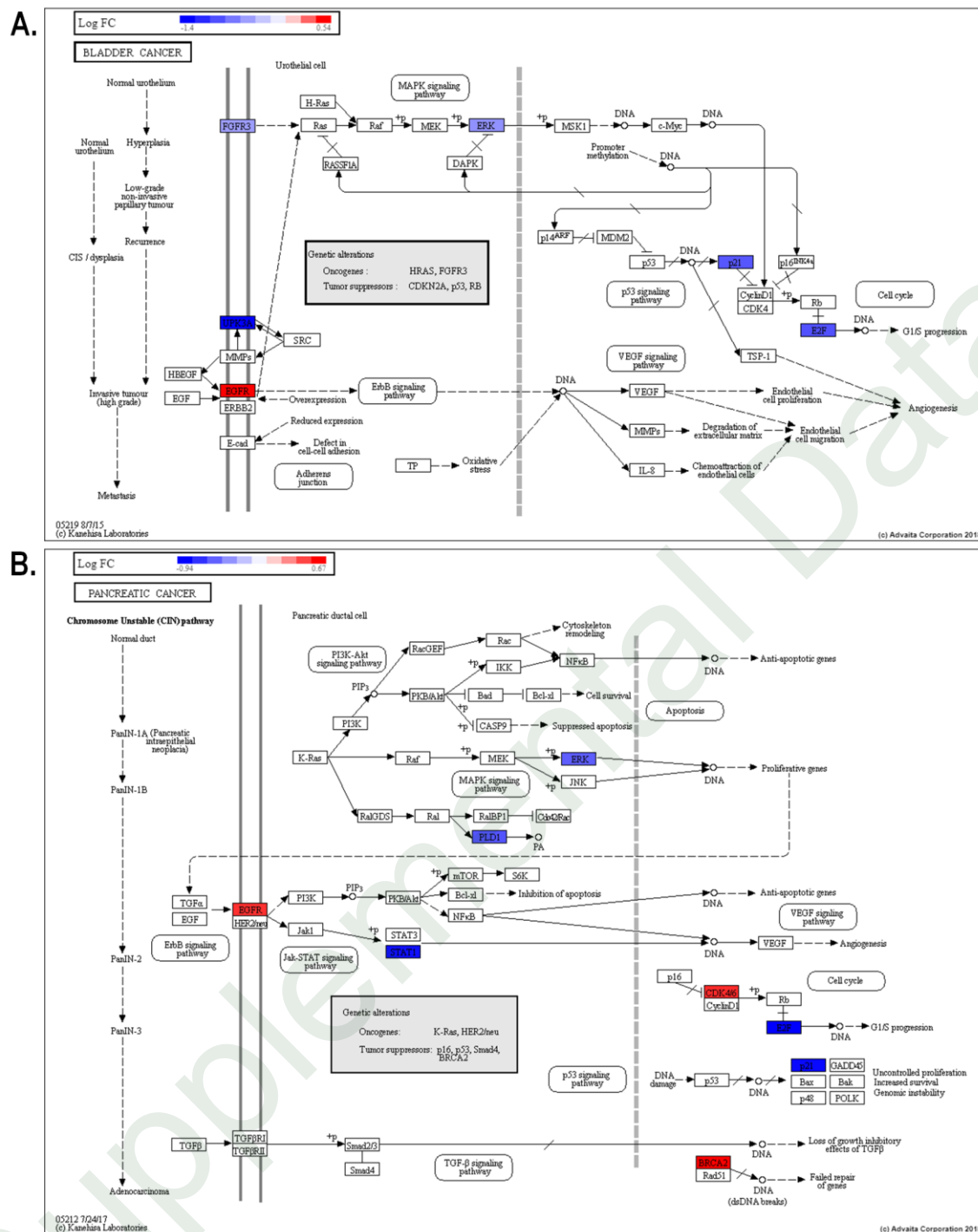


Figure S4. Avicequinone B significantly impacts the expression of targets within cancer signaling pathways. Differentially expressed genes (DEGs) between HT-29 cells treated with avicequinone B (8.20 μ M) and vehicle (control) were analyzed using iPathwayGuide online software to identify that (A) Bladder Cancer, (B) Pancreatic Cancer, and (C) Breast Cancer were significantly impacted. The heat map at the top left shows the Log₂ fold change (LogFC), where blue indicates down-regulated genes and red indicates up-regulated genes. Only those genes that meet our criteria of differential expression ($\text{Log}_2 |(\text{fold change})| \geq 0.5$, $p\text{-value} \leq 0.001$, and $q\text{-value} \leq 0.05$).

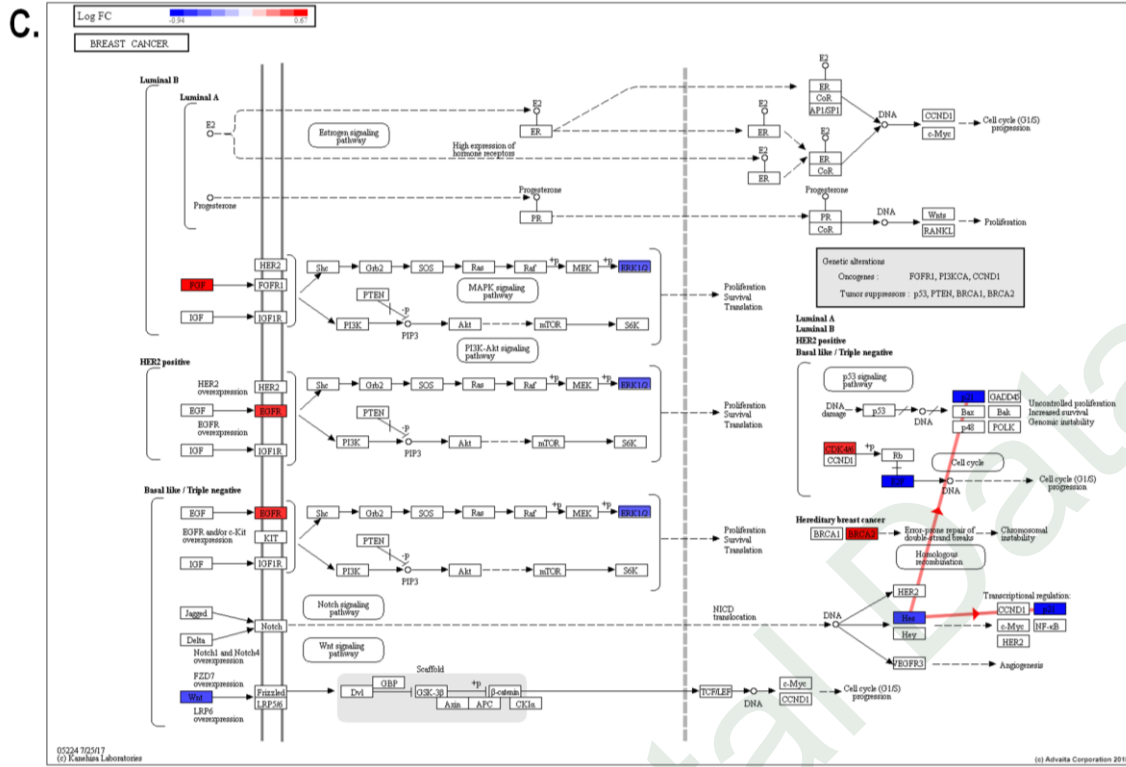
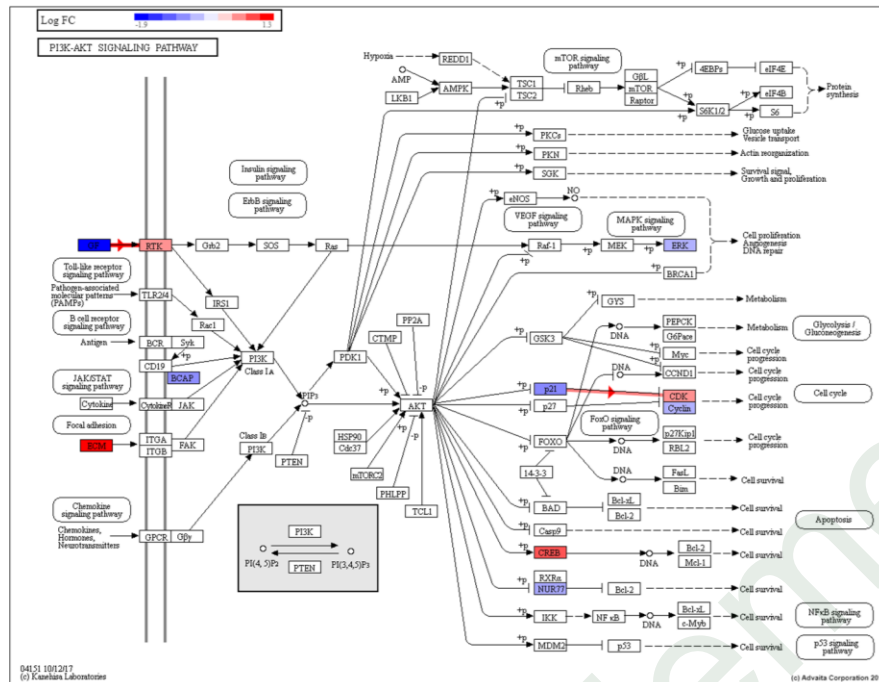


Figure S4. (Continuation)

A.



B.

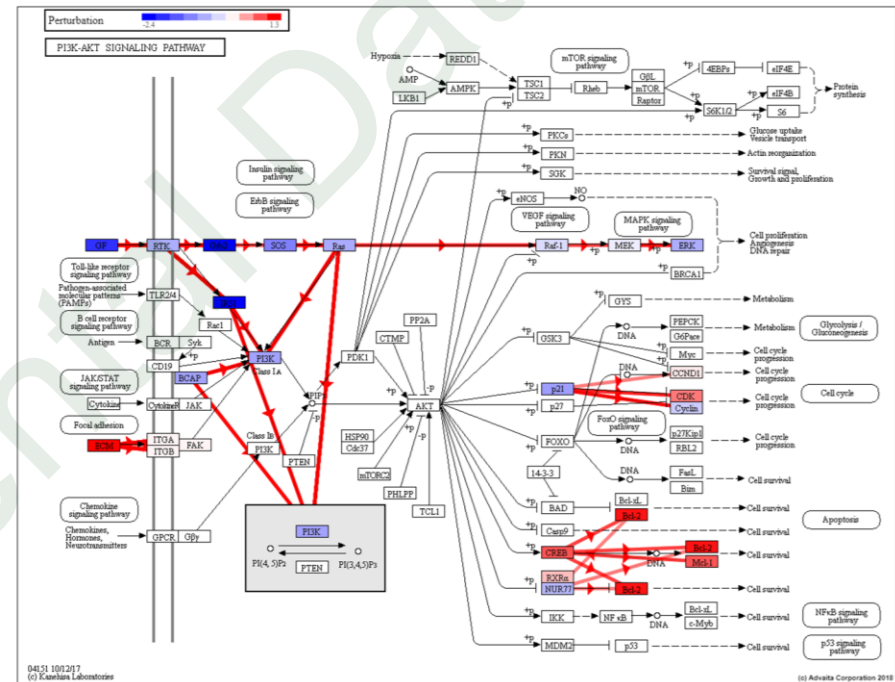


Figure S5. Avicquinone B significantly impacts the expression of targets within PI3K-AKT signaling pathway. Differentially expressed genes (DEGs) between HT-29 cells treated with compound avicquinone B (8.20 μM) and vehicle (control) were analyzed using iPathwayGuide online software. **(A)** Impact Analysis. The heat map at the top left shows the Log₂ fold change (LogFC), where blue indicates down-regulated genes and red indicates up-regulated genes. Only those genes that meet our criteria of differential expression are shown (Log₂ |(fold change)| ≥ 0.5 , p -value ≤ 0.001 , and q -value ≤ 0.05). **(B)** Perturbation analysis. The heat map at the top left shows the predicted perturbation (FC + accumulation), where blue indicates down-regulated genes and red indicates up-regulated genes, bold red highlighted arrows indicates coherent cascades.

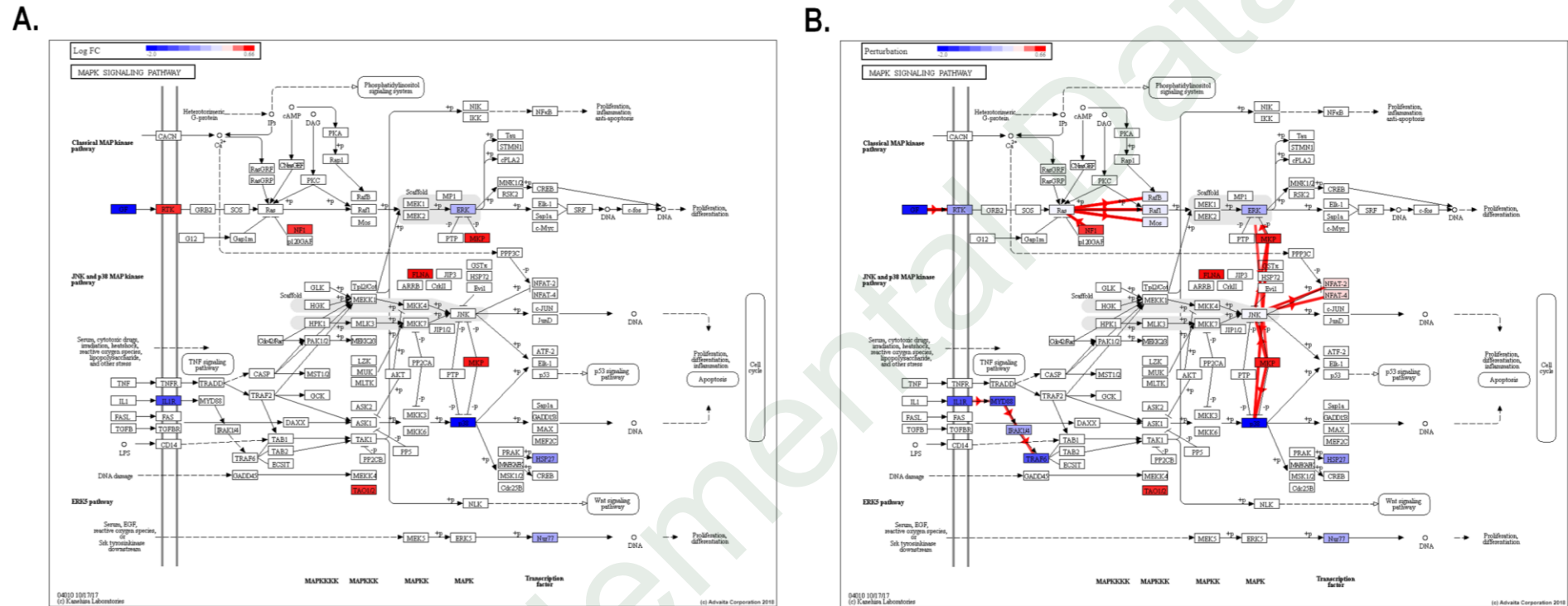


Figure S6. Avicequinone B significantly impacts the expression of targets within MAPK signaling pathway. Differentially expressed genes (DEGs) between HT-29 cells treated with compound avicequinone B (8.20 μ M) and vehicle (control) were analyzed using iPathwayGuide online software. **(A)** Impact Analysis. The heat map at the top left shows the Log₂ fold change (LogFC), where blue indicates down-regulated genes and red indicates up-regulated genes. Only those genes that meet our criteria of differential expression are shown (Log₂ |fold change| ≥ 0.5 , p -value ≤ 0.001 , and q -value ≤ 0.05). **(B)** Perturbation analysis. The heat map at the top left shows the predicted perturbation (FC + accumulation), where blue indicates down-regulated genes and red indicates up-regulated genes, bold red highlighted arrows indicate coherent cascades.

1. References

1. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
2. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. Tophat: Discovering splice junctions with rna-seq. *Bioinformatics* 2009;25(9):1105-11. doi: 10.1093/bioinformatics/btp120
3. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of rna-seq experiments with tophat and cufflinks. *Nature protocols* 2012;7(3):562-78. doi: 10.1038/nprot.2012.016
4. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. String v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* 2015;43(Database issue):D447-52. doi: 10.1093/nar/gku1003
5. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 2003;13(11):2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303
6. Andreu P, Colnot S, Godard C, Laurent-Puig P, Lamarque D, Kahn A, et al. Identification of the *ifitm* family as a new molecular marker in human colorectal tumors. *Cancer Research* 2006;66(4):1949. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2731
7. He JD, Luo HL, Li J, Feng WT, Chen LB. Influences of the interferon induced transmembrane protein 1 on the proliferation, invasion, and metastasis of the colorectal cancer sw480 cell lines. *Chinese medical journal* 2012;125(3):517-22.
8. He J, Li J, Feng W, Chen L, Yang K. Prognostic significance of inf-induced transmembrane protein 1 in colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015;8(12):16007-13.
9. Yu F, Xie D, Ng SS, Lum CT, Cai M-Y, Cheung WK, et al. Ifitm1 promotes the metastasis of human colorectal cancer via cav-1. *Cancer Letters* 2015;368(1):135-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.034>
10. Li X, Gill R, Cooper NG, Yoo JK, Datta S. Modeling microrna-mrna interactions using pls regression in human colon cancer. *BMC Medical Genomics* 2011;4(1):44. doi: 10.1186/1755-8794-4-44
11. Virag P, Fischer-Fodor E, Perde-Schrepler M, Brie I, Tatomir C, Balacescu L, et al. Oxaliplatin induces different cellular and molecular chemoresistance patterns in colorectal cancer cell lines of identical origins. *BMC Genomics* 2013;14(1):480. doi: 10.1186/1471-2164-14-480
12. Wagner S, Vlachogiannis G, De Haven Brandon A, Valenti M, Box G, Jenkins L, et al. Suppression of interferon gene expression overcomes resistance to mek inhibition in kras-mutant colorectal cancer. *Oncogene* 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0554-z
13. Tang H, Guo Q, Zhang C, Zhu J, Yang H, Zou YL, et al. Identification of an intermediate signature that marks the initial phases of the colorectal adenoma-carcinoma transition. *International journal of molecular medicine* 2010;26(5):631-41. doi: https://doi.org/10.3892/ijmm_00000508
14. Kim S-C, Hong C-W, Jang S-G, Kim Y-A, Yoo B-C, Shin Y-K, et al. Establishment and characterization of paired primary and peritoneal seeding human colorectal cancer cell lines: Identification of genes that mediate metastatic potential. *Translational Oncology* 2018;11(5):1232-43. doi: 10.1016/j.tranon.2018.07.014
15. Yu W, Lin Z, Pastor DM, Hegarty JP, Chen X, Kelly AA, et al. Genes regulated by nkx2-3 in sporadic and inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer cell lines. *Digestive diseases and sciences* 2010;55(11):3171-80. doi: 10.1007/s10620-010-1138-0

16. Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, Sleeman JP, Trunk MJ, et al. The disparate twins: A comparative study of *cxcr4* and *cxcr7* in *sdf-1 α* -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clinical Cancer Research* 2014;20(3):604-16. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-0582
17. Slattery ML, Pellatt AJ, Lee FY, Herrick JS, Samowitz WS, Stevens JR, et al. Infrequently expressed mirnas influence survival after diagnosis with colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8(48):83845-59. doi: 10.18632/oncotarget.19863
18. Dai W, Li Y, Mo S, Feng Y, Zhang L, Xu Y, et al. A robust gene signature for the prediction of early relapse in stage i-iii colon cancer. *Molecular oncology* 2018;12(4):463-75. doi: 10.1002/1878-0261.12175
19. Giarnieri E, Alderisio M, Valli C, Vecchione A, Forte A, Turano R, et al. Overexpression of *ndp* kinase *nm23* associated with ploidy image analysis in colorectal cancer. *Anticancer research* 1995;15(5B):2049-53.
20. Yamashita K, Katoh H, Watanabe M. The homeobox only protein homeobox (*hopx*) and colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 2013;14(12):23231-43. doi: 10.3390/ijms141223231
21. Oltedal S, Skaland I, Maple-Grødem J, Tjensvoll K, Janssen EAM, Gilje B, et al. Expression profiling and intracellular localization studies of the novel proline-, histidine-, and glycine-rich protein 1 suggest an essential role in gastro-intestinal epithelium and a potential clinical application in colorectal cancer diagnostics. *BMC Gastroenterology* 2018;18(1):26. doi: 10.1186/s12876-018-0752-8
22. He P, Li K, Li SB, Hu TT, Guan M, Sun FY, et al. Upregulation of *akap12* with *hdac3* depletion suppresses the progression and migration of colorectal cancer. *International journal of oncology* 2018;52(4):1305-16. doi: 10.3892/ijo.2018.4284
23. Liu W, Guan M, Su B, Ye C, Li J, Zhang X, et al. Quantitative assessment of *akap12* promoter methylation in colorectal cancer using methylation-sensitive high resolution melting: Correlation with duke's stage. *Cancer biology & therapy* 2010;9(11):862-71. doi: 10.4161/cbt.9.11.11633
24. Liu W, Guan M, Hu T, Gu X, Lu Y. Re-expression of *akap12* inhibits progression and metastasis potential of colorectal carcinoma *in vivo* and *in vitro*. *PloS one* 2011;6(8):e24015. doi: 10.1371/journal.pone.0024015
25. Luque-Garcia JL, Martinez-Torrecedrada JL, Epifano C, Canamero M, Babel I, Casal JI. Differential protein expression on the cell surface of colorectal cancer cells associated to tumor metastasis. *Proteomics* 2010;10(5):940-52. doi: 10.1002/pmic.200900441
26. Willis AJ, Indra R, Wohak LE, Sozeri O, Feser K, Mrizova I, et al. The impact of chemotherapeutic drugs on the *cypl1a1*-catalysed metabolism of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene: Effects in human colorectal hct116 *tp53*(+/+), *tp53*(+/-) and *tp53*(-/-) cells. *Toxicology* 2018;398-399:1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.02.006>
27. Pande M, Amos CI, Osterwisch DR, Chen J, Lynch PM, Broaddus R, et al. Genetic variation in genes for the xenobiotic-metabolizing enzymes *cypl1a1*, *ephx1*, *gstm1*, *gstt1*, and *gstp1* and susceptibility to colorectal cancer in lynch syndrome. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2008;17(9):2393-401. doi: 10.1158/1055-9965.epi-08-0326
28. Zheng Y, Wang J-J, Sun L, Li H-L. Association between *cypl1a1* polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *Molecular Biology Reports* 2012;39(4):3533-40. doi: 10.1007/s11033-011-1126-2

29. Chou CK, Fan CC, Lin PS, Liao PY, Tung JC, Hsieh CH, et al. Sciellin mediates mesenchymal-to-epithelial transition in colorectal cancer hepatic metastasis. *Oncotarget* 2016;7(18):25742-54. doi: 10.18632/oncotarget.8264
30. Doleman JF, Eady JJ, Elliott RM, Foxall RJ, Seers J, Johnson IT, et al. Identification of the eph receptor pathway as a novel target for eicosapentaenoic acid (epa) modification of gene expression in human colon adenocarcinoma cells (ht-29). *Nutrition & Metabolism* 2010;7(1):56. doi: 10.1186/1743-7075-7-56
31. Lundemo AG, Pettersen CH, Berge K, Berge RK, Schönberg SA. Tetradecylthioacetic acid inhibits proliferation of human sw620 colon cancer cells - gene expression profiling implies endoplasmic reticulum stress. *Lipids in Health and Disease* 2011;10(1):190. doi: 10.1186/1476-511x-10-190
32. Toda K, Kawada K, Iwamoto M, Inamoto S, Sasazuki T, Shirasawa S, et al. Metabolic alterations caused by kras mutations in colorectal cancer contribute to cell adaptation to glutamine depletion by upregulation of asparagine synthetase. *Neoplasia* 2016;18(11):654-65. doi: 10.1016/j.neo.2016.09.004
33. Zhang Z, Li Z, Wu X, Zhang C-F, Calway T, He T-C, et al. Trail pathway is associated with inhibition of colon cancer by protopanaxadiol. *Journal of Pharmacological Sciences* 2015;127(1):83-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.11.003>
34. Sheffer M, Simon AJ, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Domany E, Givol D, et al. Genome-wide analysis discloses reversal of the hypoxia-induced changes of gene expression in colon cancer cells by zinc supplementation. *Oncotarget* 2011;2(12):1191-202. doi: 10.18632/oncotarget.395
35. Lim SR, Gooi BH, Gam LH. Identification of low abundance proteins in colorectal cancer tissues. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 2012;12(4):185-98. doi: 10.3233/CBM-130307
36. Dimberg J, Strom K, Lofgren S, Zar N, Hugander A, Matussek A. Expression of the serine protease inhibitor serpina3 in human colorectal adenocarcinomas. *Oncology letters* 2011;2(3):413-8. doi: 10.3892/ol.2011.280
37. Long NP, Lee WJ, Huy NT, Lee SJ, Park JH, Kwon SW. Novel biomarker candidates for colorectal cancer metastasis: A meta-analysis of *in vitro* studies. *Cancer informatics* 2016;15(Suppl 4):11-7. doi: 10.4137/CIN.S40301
38. Peltier J, Roperch J-P, Audebert S, Borg J-P, Camoin L. Quantitative proteomic analysis exploring progression of colorectal cancer: Modulation of the serpin family. *Journal of Proteomics* 2016;148:139-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.031>
39. Murakami T, Kikuchi H, Ishimatsu H, Ino I, Hirotsu A, Matsumoto T, et al. Tenascin c in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of mir-198 as identified by microRNA analysis. *British journal of cancer* 2017;117(9):1360-70. doi: 10.1038/bjc.2017.291
40. Li M, Peng F, Li G, Fu Y, Huang Y, Chen Z, et al. Proteomic analysis of stromal proteins in different stages of colorectal cancer establishes tenascin-c as a stromal biomarker for colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2016;7(24):37226-37. doi: 10.18632/oncotarget.9362

Supplementary information

Ames mutagenicity test

Compound mutagenicity was performed employing the commercial Muta-ChromoPlate™ Ames test kit (EBPI Inc., Ontario, Canada). 8-Hydroxy-2-(2-thienylcarbonyl)naphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione (Compound 1) was mixed with *Salmonella typhimurium* (TA100) and incubated in the presence or absence of S9 fraction for 3 days

at 37°C. Subsequently, microplates were observed and wells of different colors were counted: yellow, partially yellow, or turbid wells were scored as positives while purple wells were scored negative. Sodium azide (NaN₃) and 2-aminoanthracene (2-AA) were employed as positive control and DMSO was employed as a negative control. The test results are showed in Supplementary Figure 1.

Table S1: Differentially expressed genes in HT-29 cells treated with compound 1 in comparison with control (vehicle-treated) counterparts.

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
IFITM1	NC_000011.10:313990-315272	Control	1	42.5409	1.56003	-4.76921	5.00E-05	0.00377623
IFI44L	NC_000001.11:78620381-78646145	Control	1	7.62704	0.416008	-4.19644	5.00E-05	0.00377623
OAS2	NC_000012.12:112978394-113011723	Control	1	29.0267	3.32197	-3.12727	5.00E-05	0.00377623
XAF1	NC_000017.11:6755410-6775647	Control	1	3.6127	0.433431	-3.0592	5.00E-05	0.00377623
EPSTI1	NC_000013.11:42886387-42992271	Control	1	2.74703	0.3325	-3.04644	5.00E-05	0.00377623
MX2	NC_000021.9:41304228-41408943	Control	1	6.10635	0.774039	-2.97983	5.00E-05	0.00377623
RSAD2	NC_000002.12:6828553-6898239	Control	1	3.28666	0.429985	-2.93426	5.00E-05	0.00377623
PAX4	NC_000007.14:127610291-127618192	Control	1	1.33869	0.175995	-2.92721	0.0012	0.0452256
FFAR2	NC_000019.10:35447964-35451767	Control	1	1.59041	0.22465	-2.82365	5.00E-05	0.00377623
CMPK2	NC_000002.12:6828553-6898239	Control	1	8.46783	1.22264	-2.79199	5.00E-05	0.00377623
IFIT1	NC_000010.11:89392545-89406487	Control	1	18.5847	2.73759	-2.76314	5.00E-05	0.00377623
OASL	NC_000012.12:121018881-121039242	Control	1	55.8964	8.7715	-2.67186	5.00E-05	0.00377623
DDX60	NC_000004.12:168216290-168318807	Control	1	9.93407	1.69801	-2.54854	5.00E-05	0.00377623
LAPTM5	NC_000001.11:30732467-30757840	Control	1	2.00973	0.344088	-2.54616	5.00E-05	0.00377623
IFI6	NC_000001.11:27666060-27672213	Control	1	194.867	35.143	-2.47118	5.00E-05	0.00377623
HPN	NC_000019.10:35040505-35106304	Control	1	1.69098	0.308217	-2.45584	5.00E-05	0.00377623
IFITM3	NC_000011.10:319672-320914	Control	1	250.965	46.3243	-2.43764	5.00E-05	0.00377623
SEPT4	NC_000017.11:58519836-58692055	Control	1	1.53396	0.288432	-2.41095	5.00E-05	0.00377623
PIGR	NC_000001.11:206928521-206946466	Control	1	7.01245	1.33395	-2.39422	5.00E-05	0.00377623
REG4	NC_000001.11:119794017-119811580	Control	1	70.8985	14.099	-2.33017	5.00E-05	0.00377623
IFI44	NC_000001.11:78648553-78664078	Control	1	52.6196	10.8155	-2.28251	5.00E-05	0.00377623
UBE2L6	NC_000011.10:57551654-57568330	Control	1	17.2816	3.6124	-2.2582	5.00E-05	0.00377623
MX1	NC_000021.9:41420328-41459214	Control	1	33.7418	7.13639	-2.24127	5.00E-05	0.00377623
IFI27	NC_000014.9:94110732-94116699	Control	1	651.455	139.493	-2.22347	5.00E-05	0.00377623
RCOR2	NC_000011.10:63911220-63916844	Control	1	1.69453	0.368471	-2.20126	5.00E-05	0.00377623
HOPX	NC_000004.12:56647987-56681866	Control	1	2.20683	0.481426	-2.19659	5.00E-05	0.00377623
ETNK2	NC_000001.11:204131060-204152182	Control	1	1.2446	0.273087	-2.18825	5.00E-05	0.00377623
CERCAM	NC_000009.12:128405992-128437351	Control	1	2.05444	0.45988	-2.15941	5.00E-05	0.00377623
IFIT2	NC_000010.11:89293472-89316145	Control	1	14.1052	3.17883	-2.14966	5.00E-05	0.00377623
HERC6	NC_000004.12:88378564-88506170	Control	1	13.2967	3.05724	-2.12076	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
PALM3	NC_000019.10:14053366-14062137	Control	1	3.47439	0.806585	-2.10686	5.00E-05	0.00377623
CASP1	NC_000011.10:105025507-105035591	Control	1	1.67499	0.408975	-2.03407	0.00035	0.018209
TNNC1	NC_000003.12:52451090-52454041	Control	1	14.2123	3.48515	-2.02785	5.00E-05	0.00377623
HEPACAM2	NC_000007.14:93188585-93232297	Control	1	4.04772	1.00057	-2.01629	5.00E-05	0.00377623
CD200	NC_000003.12:112332223-112362812	Control	1	5.58892	1.40126	-1.99585	5.00E-05	0.00377623
OAS1	NC_000012.12:112906776-112932190	Control	1	92.4562	23.2216	-1.9933	5.00E-05	0.00377623
SLC1A7	NC_000001.11:53087178-53142632	Control	1	2.82452	0.711706	-1.98865	5.00E-05	0.00377623
IFIT3	NC_000010.11:89327818-89344944	Control	1	32.7464	8.35109	-1.9713	5.00E-05	0.00377623
KLK12	NC_000019.10:51028953-51035651	Control	1	6.1343	1.56788	-1.96809	5.00E-05	0.00377623
NEURL1	NC_000010.11:103479602-103592552	Control	1	3.07106	0.800687	-1.93943	5.00E-05	0.00377623
ISG15	NC_000001.11:1013466-1014540	Control	1	594.444	155.927	-1.93067	5.00E-05	0.00377623
TFF3	NC_000021.9:42311666-42315596	Control	1	25.0933	6.62604	-1.92108	5.00E-05	0.00377623
ANXA13	NC_000008.11:123680793-123766246	Control	1	66.1225	17.7262	-1.89926	5.00E-05	0.00377623
AGXT	NC_000002.12:240868744-240879119	Control	1	1.67463	0.449586	-1.89718	0.00135	0.048998
ATO1H1	NC_000004.12:93828926-93829991	Control	1	5.48599	1.48548	-1.88482	5.00E-05	0.00377623
SECTM1	NC_000017.11:82321023-82334045	Control	1	4.26709	1.17759	-1.85742	5.00E-05	0.00377623
CDX1	NC_000005.10:150166780-150184558	Control	1	3.06173	0.8494	-1.84983	5.00E-05	0.00377623
SEPP1	NC_000005.10:42756817-42811922	Control	1	2.84268	0.789659	-1.84795	5.00E-05	0.00377623
UPK3A	NC_000022.11:45284986-45295874	Control	1	8.35012	2.33743	-1.83688	5.00E-05	0.00377623
RNASE1	NC_000014.9:20725951-20810034	Control	1	3.88919	1.10412	-1.81658	0.0005	0.023902
CRYM	NC_000016.10:21252990-21318591	Control	1	3.63178	1.04001	-1.80408	0.0009	0.0363522
LGALS2	NC_000022.11:37570245-37580017	Control	1	47.9498	14.0591	-1.77002	5.00E-05	0.00377623
ADH6	NC_000004.12:99088856-99301356	Control	1	3.89607	1.16144	-1.7461	5.00E-05	0.00377623
RARRES3	NC_000011.10:63536800-63546458	Control	1	157.788	47.3439	-1.73674	5.00E-05	0.00377623
APOE	NC_000019.10:44905748-44909395	Control	1	6.08789	1.85998	-1.71066	5.00E-05	0.00377623
GBP1	NC_000001.11:89034665-89102691	Control	1	1.9541	0.598215	-1.70777	0.00045	0.0220627
FAM83C	NC_000020.11:35285250-35292422	Control	1	1.13674	0.350571	-1.69713	0.00035	0.018209
GJB6	NC_000013.11:20221961-20232395	Control	1	1.30194	0.410081	-1.66668	0.00025	0.0139341
ST6GALNAC1	NC_000017.11:76617768-76643838	Control	1	3.28893	1.03885	-1.66263	5.00E-05	0.00377623
RASL11A	NC_000013.11:27270326-27273690	Control	1	40.1973	12.7888	-1.65222	5.00E-05	0.00377623
PTPRO	NC_000012.12:15322256-15598331	Control	1	7.26995	2.31945	-1.64816	5.00E-05	0.00377623
PPP1R14D	NC_000015.10:40815444-40828793	Control	1	13.2244	4.22176	-1.64729	5.00E-05	0.00377623
LCE1E	NC_000001.11:152786276-152788426	Control	1	2.82979	0.923977	-1.61477	0.00125	0.0466054
GPRC5B	NC_000016.10:19858970-19886045	Control	1	1.2985	0.428734	-1.5987	0.00045	0.0220627
NEUROG3	NC_000010.11:69571439-69577099	Control	1	3.04965	1.00694	-1.59866	0.0008	0.0338484
LINC00261	NC_000020.11:22560552-22578642	Control	1	9.96174	3.30482	-1.59182	5.00E-05	0.00377623
OAS3	NC_000012.12:112938432-112973251	Control	1	59.775	20.1462	-1.56904	5.00E-05	0.00377623
PDZK1	NC_000001.11:145607959-145707507	Control	1	8.78657	2.96481	-1.56736	5.00E-05	0.00377623
COPZ2	NC_000017.11:48026166-48048091	Control	1	4.32374	1.45966	-1.56665	0.0002	0.0117098
CX3CL1	NC_000016.10:57372460-57385048	Control	1	2.39113	0.821588	-1.5412	0.0001	0.00676519

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
WNK4	NC_000017.11:42779700-42797066	Control	1	11.1154	3.81964	-1.54105	5.00E-05	0.00377623
SLC5A9	NC_000001.11:48221112-48248644	Control	1	1.163	0.403354	-1.52774	5.00E-05	0.00377623
C1orf115	NC_000001.11:220690285-220699157	Control	1	2.02657	0.7057	-1.52192	0.0001	0.00676519
CLDN2	NC_000023.11:106900062-106930861	Control	1	62.9028	21.9756	-1.51722	5.00E-05	0.00377623
WWTR1	NC_000003.12:149517234-149724783	Control	1	1.18082	0.41256	-1.51712	5.00E-05	0.00377623
METTL7A	NC_000012.12:50923810-50932517	Control	1	3.62449	1.28364	-1.49754	5.00E-05	0.00377623
APOL3	NC_000022.11:36140322-36166177	Control	1	3.36534	1.20074	-1.48683	5.00E-05	0.00377623
SERPINA6	NC_000014.9:94304247-94323351	Control	1	6.21789	2.23421	-1.47666	5.00E-05	0.00377623
PARP9	NC_000003.12:122525589-122575203	Control	1	42.15	15.1616	-1.47511	5.00E-05	0.00377623
GPA33	NC_000001.11:167051126-167091553	Control	1	2.43622	0.880978	-1.46746	0.0001	0.00676519
DDX58	NC_000009.12:32455301-32526324	Control	1	10.5294	3.83406	-1.45748	5.00E-05	0.00377623
TRPV6	NC_000007.14:142871202-142885745	Control	1	1.52485	0.555492	-1.45683	0.00045	0.0220627
HMGCS2	NC_000001.11:119747995-119769125	Control	1	86.5147	31.6773	-1.4495	5.00E-05	0.00377623
IL1R1	NC_000002.12:102069637-102179874	Control	1	1.22748	0.450005	-1.44769	0.00095	0.0380109
USP18	NC_000022.11:18149958-18177397	Control	1	7.4884	2.74682	-1.44689	5.00E-05	0.00377623
MATN3	NC_000002.12:19990203-20012694	Control	1	2.37885	0.872873	-1.44642	0.00025	0.0139341
PRAP1	NC_000010.11:133347339-133352683	Control	1	34.2362	12.6983	-1.43088	5.00E-05	0.00377623
SERPINE1	NC_000007.14:101127086-101139266	Control	1	2.62158	0.974386	-1.42787	5.00E-05	0.00377623
ACY3	NC_000011.10:67642550-67650829	Control	1	5.15023	1.9251	-1.41971	0.0001	0.00676519
OR51E1	NC_000011.10:4643925-4655488	Control	1	3.39203	1.28136	-1.40447	5.00E-05	0.00377623
IFIH1	NC_000002.12:162267078-162318708	Control	1	13.2086	4.99383	-1.40326	5.00E-05	0.00377623
DHX58	NC_000017.11:42101403-42112733	Control	1	9.02519	3.43136	-1.39517	5.00E-05	0.00377623
CFB	NC_000006.12:31945943-31952084	Control	1	10.9144	4.14993	-1.39507	5.00E-05	0.00377623
PLEKHA4	NC_000019.10:48837091-48868627	Control	1	5.57248	2.12107	-1.39353	5.00E-05	0.00377623
SSTR5	NC_000016.10:1064080-1081454	Control	1	2.4293	0.932742	-1.38099	0.001	0.039516
TSPAN32	NC_000011.10:2296276-2318201	Control	1	1.97298	0.758769	-1.37864	5.00E-05	0.00377623
SEPT6	NC_000023.11:119615723-119693370	Control	1	2.051	0.794186	-1.36878	0.00015	0.00930899
SPHK1	NC_000017.11:76382976-76387860	Control	1	2.1454	0.831522	-1.36742	0.0004	0.020233
NTF4	NC_000019.10:49054273-49065076	Control	1	3.65749	1.42256	-1.36237	0.00115	0.0436419
PDZK1IP1	NC_000001.11:47183588-47190099	Control	1	67.8236	26.41	-1.3607	5.00E-05	0.00377623
SNTA1	NC_000020.11:33407956-33443892	Control	1	2.00009	0.780802	-1.35704	0.0003	0.0161565
RAMP1	NC_000002.12:237858713-237912117	Control	1	9.90607	3.8854	-1.35025	5.00E-05	0.00377623
TMEM37	NC_000002.12:119429911-119438520	Control	1	6.11011	2.42915	-1.33075	5.00E-05	0.00377623
AIF1L	NC_000009.12:131096475-131123152	Control	1	2.78618	1.11176	-1.32545	0.0001	0.00676519
NEURL3	NC_000002.12:96497642-96508157	Control	1	2.99216	1.21223	-1.30353	0.0007	0.0307735
C2orf72	NC_000002.12:231037565-231049714	Control	1	4.6422	1.88144	-1.30297	5.00E-05	0.00377623
CEACAM7	NC_000019.10:41673306-41688277	Control	1	1.88004	0.761996	-1.30291	0.0009	0.0363522
VGLL1	NC_000023.11:136532151-136556807	Control	1	7.4013	3.01738	-1.29448	0.0001	0.00676519
RHOV	NC_000015.10:40872213-40874289	Control	1	6.57375	2.68399	-1.29234	0.0001	0.00676519
PDZD3	NC_000011.10:119185456-119190223	Control	1	2.43678	0.995735	-1.29114	0.00015	0.00930899
IHH	NC_000002.12:219054419-219060516	Control	1	16.0267	6.59711	-1.28057	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
CDKN1C	NC_000011.10:2883217-2885804	Control	1	7.77228	3.22157	-1.27057	5.00E-05	0.00377623
ASAP3	NC_000001.11:23428562-23484631	Control	1	3.44949	1.44126	-1.25905	5.00E-05	0.00377623
SCAMP5	NC_000015.10:74995534-75021495	Control	1	4.23013	1.77083	-1.25627	5.00E-05	0.00377623
HES6	NC_000002.12:238238266-238240124	Control	1	36.1551	15.2093	-1.24925	5.00E-05	0.00377623
CD74	NC_000005.10:150401636-150412936	Control	1	12.0218	5.06458	-1.24714	5.00E-05	0.00377623
BLVRA	NC_000007.14:43754840-43839020	Control	1	6.18426	2.60587	-1.24683	0.00055	0.0257143
PSMB9	NC_000006.12:32854160-32859851	Control	1	10.7217	4.52236	-1.24538	0.00015	0.00930899
NPY6R	NC_000005.10:137801192-137810751	Control	1	2.81958	1.19028	-1.24418	0.0001	0.00676519
RARRES2	NC_000007.14:150338317-150341685	Control	1	18.8919	8.00998	-1.2379	5.00E-05	0.00377623
CIB2	NC_000015.10:78104605-78131976	Control	1	4.29633	1.82516	-1.23508	0.00015	0.00930899
CD6	NC_000011.10:60971640-61020377	Control	1	1.55958	0.663213	-1.23361	0.0005	0.023902
APOC1	NC_000019.10:44914246-44919349	Control	1	12.5004	5.32361	-1.2315	0.0005	0.023902
LOXL1	NC_000015.10:73917467-73952141	Control	1	9.89426	4.23132	-1.22548	5.00E-05	0.00377623
P3H2	NC_000003.12:189956727-190144846	Control	1	6.97843	3.01077	-1.21277	5.00E-05	0.00377623
SOWAHA	NC_000005.10:132813323-132816797	Control	1	2.01462	0.873065	-1.20634	0.00025	0.0139341
CHN2	NC_000007.14:29146546-29563728	Control	1	3.62949	1.57753	-1.2021	5.00E-05	0.00377623
HYAL1	NC_000003.12:50299888-50312951	Control	1	4.28803	1.87045	-1.19693	0.0001	0.00676519
HLA-DMB	NC_000006.12:32934628-32941070	Control	1	9.86258	4.303	-1.19662	5.00E-05	0.00377623
CLDN9	NC_000016.10:3012455-3014505	Control	1	6.01097	2.62337	-1.19618	5.00E-05	0.00377623
GGT6	NC_000017.11:4556926-4560596	Control	1	15.0588	6.57461	-1.19563	5.00E-05	0.00377623
SP110	NC_000002.12:230165465-230316571	Control	1	16.369	7.15027	-1.1949	5.00E-05	0.00377623
CARNS1	NC_000011.10:67415677-67425607	Control	1	2.10177	0.920241	-1.19152	0.00015	0.00930899
MYO7B	NC_000002.12:127535688-127637728	Control	1	2.67765	1.17447	-1.18896	5.00E-05	0.00377623
TMEM150B	NC_000019.10:55284100-55334043	Control	1	8.3099	3.66768	-1.17996	0.001	0.039516
NNMT	NC_000011.10:114295812-114312516	Control	1	19.4155	8.66176	-1.16448	5.00E-05	0.00377623
TNFSF10	NC_000003.12:172505507-172523507	Control	1	23.9149	10.6785	-1.16319	5.00E-05	0.00377623
LY6E	NC_000008.11:143018484-143022410	Control	1	326.82	146.25	-1.16006	5.00E-05	0.00377623
MAP1LC3A	NC_000020.11:34546822-34560345	Control	1	26.0717	11.6861	-1.15769	5.00E-05	0.00377623
LOC100130111	NC_000015.10:29674934-29679163	Control	1	3.29906	1.48288	-1.15365	0.00035	0.018209
FAM105A	NC_000005.10:14581781-14616180	Control	1	17.2444	7.76754	-1.15059	5.00E-05	0.00377623
MATN2	NC_000008.11:97869020-98036720	Control	1	3.09348	1.3954	-1.14855	5.00E-05	0.00377623
AGR3	NC_000007.14:16854710-16881989	Control	1	46.1377	20.8632	-1.14498	5.00E-05	0.00377623
AQP3	NC_000009.12:33441153-33447633	Control	1	79.7312	36.1323	-1.14185	5.00E-05	0.00377623
IFIT5	NC_000010.11:89413855-89421506	Control	1	6.26689	2.84145	-1.14112	5.00E-05	0.00377623
GAMT	NC_000019.10:1397025-1401570	Control	1	6.03035	2.73504	-1.14068	0.00055	0.0257143
AQP7	NC_000009.12:33383134-33410302	Control	1	1.20752	0.548162	-1.13938	0.00125	0.0466054
KCNH2	NC_000007.14:150944955-150978314	Control	1	8.38604	3.81182	-1.13751	5.00E-05	0.00377623
PARP12	NC_000007.14:140023743-140063721	Control	1	21.9367	9.9767	-1.13671	5.00E-05	0.00377623
HLA-B	NC_000006.12:31353865-31357245	Control	1	15.8849	7.23123	-1.13534	5.00E-05	0.00377623
LOC107984897	NC_000016.10:78051314-78066418	Control	1	11.3586	5.17881	-1.13309	0.00045	0.0220627

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
IRF9	NC_000014.9:24161212-24166565	Control	1	29.1482	13.4353	-1.11738	5.00E-05	0.00377623
PLSCR4	NC_000003.12:146192334-146251179	Control	1	2.10764	0.971802	-1.1169	0.00025	0.0139341
UBA7	NC_000003.12:49805204-49813958	Control	1	4.75	2.19586	-1.11314	5.00E-05	0.00377623
LYPD6B	NC_000002.12:149038466-149215262	Control	1	2.71453	1.2567	-1.11106	0.00065	0.0291442
LRRC31	NC_000003.12:169839174-169869935	Control	1	2.4132	1.12679	-1.09873	0.0009	0.0363522
TCEA3	NC_000001.11:23379952-23424779	Control	1	24.0537	11.2426	-1.09729	5.00E-05	0.00377623
POU2AF1	NC_000011.10:111352250-111379432	Control	1	2.39618	1.1225	-1.09403	0.00015	0.00930899
HSH2D	NC_000019.10:16134027-16158575	Control	1	7.62096	3.58722	-1.08711	5.00E-05	0.00377623
EVL	NC_000014.9:99971453-100144236	Control	1	2.59081	1.22485	-1.08079	0.0009	0.0363522
PLSCR1	NC_000003.12:146515177-146544841	Control	1	93.6336	44.2757	-1.08051	5.00E-05	0.00377623
MR1	NC_000001.11:181033378-181061938	Control	1	1.25083	0.594021	-1.0743	0.00025	0.0139341
PARM1	NC_000004.12:74933074-75080901	Control	1	2.21097	1.05128	-1.07254	0.0002	0.0117098
FAM131C	NC_000001.11:16057768-16073632	Control	1	4.00417	1.91672	-1.06287	0.00115	0.0436419
FOLR1	NC_000011.10:72189557-72196323	Control	1	15.7596	7.60115	-1.05195	5.00E-05	0.00377623
CLEC3A	NC_000016.10:78022545-78032106	Control	1	89.462	43.5238	-1.03947	5.00E-05	0.00377623
BST2	NC_000019.10:17402938-17405648	Control	1	214.436	104.72	-1.03401	5.00E-05	0.00377623
COCH	NC_000014.9:30874495-30890618	Control	1	2.93872	1.43541	-1.03373	0.0012	0.0452256
ALDH1L1	NC_000003.12:126103560-126210169	Control	1	3.99044	1.95005	-1.03304	0.00015	0.00930899
ZNF358	NC_000019.10:7513879-7534009	Control	1	12.5802	6.18416	-1.0245	0.00035	0.018209
TBX10	NC_000011.10:67631302-67639560	Control	1	8.08904	3.97932	-1.02344	0.00045	0.0220627
SOSTDC1	NC_000007.14:16461480-16496513	Control	1	8.23663	4.05474	-1.02244	0.00015	0.00930899
PPP1R1B	NC_000017.11:39626207-39636625	Control	1	63.6854	31.4151	-1.0195	5.00E-05	0.00377623
CHST3	NC_000010.11:71964361-72013564	Control	1	2.06385	1.02051	-1.01605	0.0001	0.00676519
NOX1	NC_000023.11:100843323-100874345	Control	1	25.875	12.8817	-1.00624	5.00E-05	0.00377623
CDC42EP5	NC_000019.10:54465024-54473290	Control	1	27.8949	13.9171	-1.00315	5.00E-05	0.00377623
TNFAIP8L3	NC_000015.10:51056595-51105276	Control	1	7.44057	3.73179	-0.995545	5.00E-05	0.00377623
DEPTOR	NC_000008.11:119873654-120056202	Control	1	9.19854	4.61834	-0.994031	5.00E-05	0.00377623
TRABD2A	NC_000002.12:84821649-84881975	Control	1	4.25876	2.14717	-0.987995	0.0013	0.0479098
AQP1	NC_000007.14:30911799-30925516	Control	1	9.45705	4.78733	-0.98217	5.00E-05	0.00377623
HELZ2	NC_000020.11:63558085-63574239	Control	1	20.7858	10.5389	-0.979877	5.00E-05	0.00377623
TMPRSS4	NC_000011.10:118015771-118125505	Control	1	42.9256	21.7779	-0.978973	5.00E-05	0.00377623
CTSO	NC_000004.12:155924117-155953896	Control	1	4.08686	2.08054	-0.97403	0.0005	0.023902
PARP14	NC_000003.12:122680725-122730840	Control	1	36.2684	18.5363	-0.968357	5.00E-05	0.00377623
NECTIN3	NC_000003.12:111071758-111201444	Control	1	13.7388	7.0227	-0.968158	5.00E-05	0.00377623
SLC4A4	NC_000004.12:71187285-71572087	Control	1	1.47986	0.760926	-0.959631	0.00025	0.0139341
MYCL	NC_000001.11:39895423-39902015	Control	1	5.70535	2.93605	-0.958439	0.00015	0.00930899
HLA-DMA	NC_000006.12:32948613-32953122	Control	1	18.1999	9.36802	-0.958114	5.00E-05	0.00377623
ADGRB2	NC_000001.11:31727104-31764063	Control	1	2.15238	1.11146	-0.953475	0.0003	0.0161565
SDC3	NC_000001.11:30869465-30909735	Control	1	2.72102	1.40701	-0.951517	5.00E-05	0.00377623
CLIC3	NC_000009.12:136994607-136997929	Control	1	53.3757	27.6041	-0.951299	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
SAMHD1	NC_000020.11:36873070-36951843	Control	1	16.6349	8.6064	-0.950732	5.00E-05	0.00377623
SLC7A7	NC_000014.9:22773221-22819811	Control	1	14.7377	7.62635	-0.950449	5.00E-05	0.00377623
SLC38A11	NC_000002.12:164897744-164955721	Control	1	3.74059	1.93676	-0.949617	0.0006	0.027416
PLD1	NC_000003.12:171600403-171810494	Control	1	12.0577	6.26099	-0.945495	5.00E-05	0.00377623
C2orf54	NC_000002.12:240886047-240896889	Control	1	12.5282	6.52606	-0.940899	5.00E-05	0.00377623
CFH	NC_000001.11:196651877-196747504	Control	1	16.5425	8.62837	-0.939022	5.00E-05	0.00377623
WNT10A	NC_000002.12:218859822-218893931	Control	1	10.848	5.65966	-0.938648	5.00E-05	0.00377623
APOL1	NC_000022.11:36253070-36267531	Control	1	73.3644	38.3059	-0.937513	5.00E-05	0.00377623
F2R	NC_000005.10:76716042-76735780	Control	1	26.5476	13.9167	-0.93176	5.00E-05	0.00377623
SERPINA4	NC_000014.9:94561419-94569913	Control	1	6.39001	3.35145	-0.931034	0.00025	0.0139341
KIF12	NC_000009.12:114091622-114100099	Control	1	16.5629	8.70514	-0.928013	5.00E-05	0.00377623
PDZRN3	NC_000003.12:73382429-73627899	Control	1	2.95871	1.55612	-0.92702	0.0004	0.020233
RGS16	NC_000001.11:182598622-182604413	Control	1	6.50438	3.42598	-0.924895	5.00E-05	0.00377623
PAG1	NC_000008.11:80967809-81112080	Control	1	1.18402	0.624241	-0.923517	0.00085	0.0351483
TMEM86A	NC_000011.10:18698734-18726939	Control	1	4.40746	2.32842	-0.920598	0.0003	0.0161565
MSLN	NC_000016.10:760745-768865	Control	1	6.71097	3.55263	-0.917634	5.00E-05	0.00377623
AIFM3	NC_000022.11:20965129-20981360	Control	1	8.84598	4.69095	-0.91514	5.00E-05	0.00377623
TAP1	NC_000006.12:32840716-32853971	Control	1	15.0916	8.01411	-0.913132	0.0007	0.0307735
DEGS2	NC_000014.9:100146415-100166886	Control	1	46.9666	24.942	-0.913057	5.00E-05	0.00377623
HPGD	NC_000004.12:174490176-174541049	Control	1	11.6522	6.2105	-0.907826	5.00E-05	0.00377623
FOXA3	NC_000019.10:45864259-45873797	Control	1	13.6881	7.32293	-0.902425	5.00E-05	0.00377623
PARP10	NC_000008.11:143977151-143986471	Control	1	15.095	8.11571	-0.895279	5.00E-05	0.00377623
MDK	NC_000011.10:46380783-46383837	Control	1	116.157	62.4978	-0.894195	5.00E-05	0.00377623
SOD3	NC_000004.12:24795462-24800845	Control	1	8.92351	4.8026	-0.893798	0.00065	0.0291442
PACSN3	NC_000011.10:47177521-47186459	Control	1	6.19168	3.33434	-0.89293	0.00085	0.0351483
TUBB2A	NC_000006.12:3153665-3157549	Control	1	19.0084	10.2625	-0.88926	5.00E-05	0.00377623
HEPH	NC_000023.11:66162525-66267389	Control	1	15.1066	8.15704	-0.889065	5.00E-05	0.00377623
CTSV	NC_000009.12:97029676-97039643	Control	1	5.50947	2.9858	-0.883795	5.00E-05	0.00377623
CA2	NC_000008.11:85438826-85481492	Control	1	45.0742	24.4823	-0.880559	5.00E-05	0.00377623
APOL2	NC_000022.11:36226208-36239954	Control	1	31.3053	17.0595	-0.875833	5.00E-05	0.00377623
IQGAP2	NC_000005.10:76403254-76708132	Control	1	9.71864	5.29785	-0.875349	5.00E-05	0.00377623
STAT1	NC_000002.12:190969035-191014250	Control	1	71.1877	38.809	-0.875237	5.00E-05	0.00377623
SMPD1	NC_000011.10:6390300-6394998	Control	1	4.85654	2.65034	-0.873753	0.00045	0.0220627
ZG16B	NC_000016.10:2830171-2832284	Control	1	24.1402	13.1845	-0.8726	0.00015	0.00930899
BTG2	NC_000001.11:203305535-203309602	Control	1	27.6493	15.1457	-0.86833	5.00E-05	0.00377623
HES4	NC_000001.11:998961-1001052	Control	1	13.2588	7.26933	-0.867051	0.0009	0.0363522
SEMA4A	NC_000001.11:156149672-156177751	Control	1	6.966	3.81923	-0.867047	0.0001	0.00676519
CDH3	NC_000016.10:68644819-68727573	Control	1	4.72372	2.59165	-0.866052	0.00025	0.0139341
FXYD3	NC_000019.10:35115820-35124324	Control	1	110.639	61.0219	-0.858464	5.00E-05	0.00377623
NME4	NC_000016.10:382240-400754	Control	1	56.7499	31.3589	-0.855744	5.00E-05	0.00377623
LGALS4	NC_000019.10:38801670-38813544	Control	1	1115.86	618.829	-0.850546	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
C19orf66	NC_000019.10:10086118-10106194	Control	1	14.8958	8.26645	-0.849562	5.00E-05	0.00377623
MMP14	NC_000014.9:22836532-22847600	Control	1	3.77273	2.10785	-0.839836	0.0007	0.0307735
MELTF	NC_000003.12:197001739-197029816	Control	1	15.3625	8.61329	-0.834773	0.00015	0.00930899
IFI35	NC_000017.11:43006724-43014459	Control	1	38.3569	21.5668	-0.830669	5.00E-05	0.00377623
NXPH4	NC_000012.12:57216794-57226449	Control	1	23.6453	13.2973	-0.830416	5.00E-05	0.00377623
DRAM1	NC_000012.12:101877326-101923623	Control	1	8.45042	4.76289	-0.827187	5.00E-05	0.00377623
BAIAP2L2	NC_000022.11:38084888-38110944	Control	1	8.02986	4.52674	-0.826901	0.0001	0.00676519
IGFBP2	NC_000002.12:216632827-216664436	Control	1	21.7493	12.2874	-0.823783	0.00025	0.0139341
GGT7	NC_000020.11:34844719-34872858	Control	1	5.37522	3.04276	-0.820944	0.00095	0.0380109
FAM3D	NC_000003.12:58505135-58706084	Control	1	33.3341	18.8927	-0.819171	5.00E-05	0.00377623
QPRT	NC_000016.10:29670587-29698699	Control	1	46.8248	26.555	-0.818289	5.00E-05	0.00377623
SLC23A3	NC_000002.12:219161458-219170095	Control	1	5.82299	3.31238	-0.813893	0.00105	0.0410261
GJB1	NC_000023.11:71215211-71225215	Control	1	71.0491	40.5886	-0.80774	5.00E-05	0.00377623
TCN2	NC_000022.11:30607082-30627060	Control	1	26.2698	15.0868	-0.800121	5.00E-05	0.00377623
LMO4	NC_000001.11:87328467-87348923	Control	1	32.3606	18.6075	-0.79835	5.00E-05	0.00377623
MUC1	NC_000001.11:155185823-155192915	Control	1	8.40938	4.83573	-0.798265	0.00035	0.018209
FCGRT	NC_000019.10:49512278-49526428	Control	1	112.03	64.7843	-0.790174	5.00E-05	0.00377623
ID2	NC_000002.12:8681982-8684453	Control	1	60.2716	35.0174	-0.783406	5.00E-05	0.00377623
DDX60L	NC_000004.12:168356734-168480514	Control	1	4.2996	2.50426	-0.779815	0.0001	0.00676519
RAP1GAP	NC_000001.11:21596214-21669444	Control	1	57.1539	33.3557	-0.776917	5.00E-05	0.00377623
TSPAN12	NC_000007.14:120787319-120858369	Control	1	15.5636	9.09055	-0.775732	5.00E-05	0.00377623
SELENBP1	NC_000001.11:151364301-151372734	Control	1	43.1518	25.4239	-0.763238	5.00E-05	0.00377623
EPN3	NC_000017.11:50532686-50543750	Control	1	10.7087	6.31522	-0.761875	0.0001	0.00676519
EHHADH	NC_000003.12:185162900-185282886	Control	1	3.92642	2.31732	-0.760761	0.0007	0.0307735
PIK3AP1	NC_000010.11:96587099-96720522	Control	1	8.43957	4.98342	-0.760033	5.00E-05	0.00377623
CEBPD	NC_000008.11:47736913-47738164	Control	1	17.2159	10.1706	-0.759335	0.00055	0.0257143
TNNT1	NC_000019.10:55132697-55149354	Control	1	27.8027	16.4716	-0.75524	0.00025	0.0139341
MGAT3	NC_000022.11:39447165-39492194	Control	1	3.83881	2.27836	-0.752663	0.0003	0.0161565
HLA2	NC_000003.12:108296489-108378285	Control	1	20.1767	12.0096	-0.748503	5.00E-05	0.00377623
GBP2	NC_000001.11:89106131-89126159	Control	1	9.95608	5.93947	-0.745243	5.00E-05	0.00377623
CRAT	NC_000009.12:129094793-129110791	Control	1	36.0459	21.5406	-0.742773	5.00E-05	0.00377623
C12orf57	NC_000012.12:6943437-6946003	Control	1	77.633	46.4021	-0.742479	5.00E-05	0.00377623
PRR15L	NC_000017.11:47951966-47957905	Control	1	50.8797	30.5257	-0.737063	5.00E-05	0.00377623
BGN	NC_000023.11:153447664-153509554	Control	1	48.1792	28.9303	-0.735827	5.00E-05	0.00377623
ATP1B1	NC_000001.11:169106708-169462221	Control	1	297.791	178.942	-0.734807	5.00E-05	0.00377623
WNT11	NC_000011.10:76186325-76210842	Control	1	19.6365	11.8258	-0.731607	0.00025	0.0139341
TRIM21	NC_000011.10:4384896-4393696	Control	1	22.3151	13.4645	-0.728859	5.00E-05	0.00377623
AZGP1	NC_000007.14:99966726-99976112	Control	1	38.3646	23.2823	-0.720543	0.0001	0.00676519
TMEM159	NC_000016.10:20933110-21180616	Control	1	28.0637	17.0463	-0.719247	5.00E-05	0.00377623
LGALS9	NC_000017.11:27631147-27649560	Control	1	44.9719	27.3747	-0.716179	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
AQP5	NC_000012.12:49950740-49978444	Control	1	40.009	24.4129	-0.712676	5.00E-05	0.00377623
IL17RE	NC_000003.12:9902085-9916402	Control	1	12.0954	7.38759	-0.71128	0.00015	0.00930899
FAM210B	NC_000020.11:56358926-56368663	Control	1	11.5373	7.06792	-0.706948	0.0004	0.020233
CDHR5	NC_000011.10:616564-625067	Control	1	16.4447	10.0959	-0.703859	0.0008	0.0338484
KALRN	NC_000003.12:124033340-124726325	Control	1	10.3089	6.33122	-0.703332	0.0002	0.0117098
TMPRSS2	NC_000021.9:41464550-41508158	Control	1	17.185	10.5691	-0.701295	5.00E-05	0.00377623
SLC40A1	NC_000002.12:189560589-189580811	Control	1	96.3051	59.2328	-0.701215	5.00E-05	0.00377623
TACSTD2	NC_000001.11:58575422-58577494	Control	1	31.0952	19.1745	-0.697501	5.00E-05	0.00377623
LAMB2	NC_000003.12:49121113-49133166	Control	1	10.4297	6.43361	-0.697003	5.00E-05	0.00377623
TOR1B	NC_000009.12:129803142-129811424	Control	1	22.716	14.0144	-0.696802	5.00E-05	0.00377623
FBP1	NC_000009.12:94603132-94640257	Control	1	96.7572	59.7312	-0.695885	5.00E-05	0.00377623
STYK1	NC_000012.12:10618922-10674318	Control	1	8.09943	5.00751	-0.693727	0.00095	0.0380109
CREB3L1	NC_000011.10:46277637-46321422	Control	1	99.4763	61.536	-0.69292	5.00E-05	0.00377623
ZC3HAV1	NC_000007.14:139043518-139109720	Control	1	19.0422	11.7966	-0.690833	0.00035	0.018209
GPC4	NC_000023.11:133301035-133415177	Control	1	15.7965	9.8048	-0.688041	5.00E-05	0.00377623
FUCA1	NC_000001.11:23845076-23868369	Control	1	44.7016	27.783	-0.686121	5.00E-05	0.00377623
KLHDC7A	NC_000001.11:18480929-18485999	Control	1	8.67603	5.41245	-0.680752	0.0001	0.00676519
ATP6V1B1	NC_000002.12:70935867-70965431	Control	1	34.4334	21.5045	-0.679174	5.00E-05	0.00377623
S100A2	NC_000001.11:153561107-153565830	Control	1	39.2015	24.5387	-0.675851	0.0007	0.0307735
TSHZ1	NC_000018.10:75210754-75289950	Control	1	5.86558	3.67512	-0.67448	0.00035	0.018209
PKDCC	NC_000002.12:42048020-42058528	Control	1	32.9204	20.6371	-0.673739	5.00E-05	0.00377623
HGD	NC_000003.12:120628167-120682571	Control	1	19.7631	12.4526	-0.666362	0.00045	0.0220627
PML	NC_000015.10:73994672-74047819	Control	1	22.3757	14.1203	-0.664166	0.0002	0.0117098
SESN1	NC_000006.12:108848409-109094505	Control	1	11.6179	7.33366	-0.663743	0.0005	0.023902
MCAM	NC_000011.10:119308523-119317132	Control	1	22.3692	14.1614	-0.659553	0.0001	0.00676519
EFNA2	NC_000019.10:1282816-1301431	Control	1	20.6362	13.0679	-0.659148	0.00025	0.0139341
TMEM173	NC_000005.10:139475527-139482790	Control	1	16.8378	10.663	-0.659085	0.00075	0.0322677
TNS1	NC_000002.12:217799788-217992615	Control	1	7.34862	4.66956	-0.654187	0.00015	0.00930899
ASS1	NC_000009.12:130444706-130502592	Control	1	47.1206	29.951	-0.653752	0.0001	0.00676519
MAOA	NC_000023.11:43654906-43746824	Control	1	18.1152	11.525	-0.652436	5.00E-05	0.00377623
AOC1	NC_000007.14:150818963-150877309	Control	1	36.0015	22.9213	-0.651368	0.00015	0.00930899
PLIN2	NC_000009.12:19108390-19127606	Control	1	11.2308	7.1509	-0.651266	0.0013	0.0479098
SRCIN1	NC_000017.11:38530014-38607166	Control	1	4.62468	2.94941	-0.648928	0.00075	0.0322677
HOXA11-AS	NC_000007.14:27185407-27189293	Control	1	32.2607	20.5939	-0.647562	0.00015	0.00930899
CLRN3	NC_000010.11:127877840-127892947	Control	1	24.7284	15.798	-0.646424	0.00115	0.0436419
ACSF2	NC_000017.11:50426157-50474845	Control	1	43.4267	27.8127	-0.642836	5.00E-05	0.00377623
STXBP6	NC_000014.9:24809653-25050297	Control	1	4.72163	3.03455	-0.637803	0.00135	0.048998
EDN1	NC_000006.12:12256463-12297194	Control	1	15.9831	10.2967	-0.634356	0.00065	0.0291442
SLC29A4	NC_000007.14:5274310-5304073	Control	1	22.6862	14.6288	-0.633002	0.00015	0.00930899
EFNA1	NC_000001.11:155127872-155134910	Control	1	27.9665	18.0469	-0.63195	0.0007	0.0307735

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
SYT7	NC_000011.10:61513715-61588404	Control	1	15.0129	9.70403	-0.629547	0.0002	0.0117098
MTSS1L	NC_000016.10:70661203-70686207	Control	1	12.5524	8.12294	-0.627892	5.00E-05	0.00377623
GATA2	NC_000003.12:128479421-128503207	Control	1	43.0738	27.8762	-0.627777	0.00065	0.0291442
YPEL3	NC_000016.10:30092313-30096216	Control	1	39.1411	25.3795	-0.625023	0.00115	0.0436419
PXDC1	NC_000006.12:3722601-3752012	Control	1	19.6238	12.7318	-0.624168	0.001	0.039516
ANXA9	NC_000001.11:150982022-150995638	Control	1	35.5593	23.085	-0.623267	0.00015	0.00930899
AGR2	NC_000007.14:16791810-16805114	Control	1	587.194	383.447	-0.614809	5.00E-05	0.00377623
IFITM2	NC_000011.10:308106-309410	Control	1	110.472	72.1797	-0.614016	0.0001	0.00676519
HSPB1	NC_000007.14:76302557-76304297	Control	1	377.485	247.432	-0.609389	0.0002	0.0117098
FGFR3	NC_000004.12:1793298-1808872	Control	1	21.453	14.0693	-0.608627	0.0002	0.0117098
PLXND1	NC_000003.12:129555212-129606739	Control	1	21.7408	14.318	-0.602576	0.00015	0.00930899
QPCT	NC_000002.12:37344609-37373322	Control	1	90.1117	59.3533	-0.602386	0.0001	0.00676519
PAPSS2	NC_000010.11:87659718-87747705	Control	1	36.5868	24.1481	-0.599418	0.0001	0.00676519
B2M	NC_000015.10:44711486-44718159	Control	1	1159.84	765.726	-0.599029	5.00E-05	0.00377623
BCAM	NC_000019.10:44809058-44821421	Control	1	142.703	94.3964	-0.59621	0.00025	0.0139341
ADRA2A	NC_000010.11:111077031-111080907	Control	1	15.5104	10.2622	-0.595888	0.0004	0.020233
KCNK5	NC_000006.12:39188970-39229475	Control	1	16.8685	11.2453	-0.585007	0.0004	0.020233
SPATA20	NC_000017.11:50547088-50555852	Control	1	23.6239	15.7598	-0.583998	0.0006	0.027416
STAT2	NC_000012.12:56341596-56360253	Control	1	9.6357	6.43894	-0.581567	0.00105	0.0410261
TDRD7	NC_000009.12:97412019-97496125	Control	1	13.8804	9.28991	-0.579312	0.0011	0.0422045
CKB	NC_000014.9:103519657-103522859	Control	1	401.562	269.105	-0.577453	0.0001	0.00676519
ST3GAL2	NC_000016.10:70379434-70439088	Control	1	11.6022	7.7789	-0.576763	0.0003	0.0161565
MPZL2	NC_000011.10:118253415-118264536	Control	1	34.8119	23.365	-0.575232	0.0006	0.027416
APOL6	NC_000022.11:35648316-35668409	Control	1	4.10394	2.75492	-0.574999	0.001	0.039516
MAGED2	NC_000023.11:54807598-54816015	Control	1	40.9655	27.5043	-0.574751	0.00045	0.0220627
MAPK3	NC_000016.10:30114104-30123309	Control	1	43.8144	29.446	-0.573334	0.00125	0.0466054
LOC100294145	NC_000006.12:32894175-32903758	Control	1	11.5766	7.79627	-0.570354	0.00135	0.048998
IL22RA1	NC_000001.11:24119770-24143285	Control	1	27.4222	18.529	-0.565563	0.0001	0.00676519
HLA-C	NC_000006.12:31268748-31272136	Control	1	57.051	38.5651	-0.564953	0.00045	0.0220627
SLITRK6	NC_000013.11:85792786-85799348	Control	1	20.2884	13.791	-0.556932	0.00065	0.0291442
SP100	NC_000002.12:230416155-230545602	Control	1	39.4593	26.8322	-0.556402	0.0013	0.0479098
WFS1	NC_000004.12:6260367-6308709	Control	1	41.9984	28.6329	-0.552661	0.0002	0.0117098
HID1	NC_000017.11:74950741-74975728	Control	1	24.6624	16.8321	-0.551094	0.00055	0.0257143
CAPN5	NC_000011.10:77066944-77126155	Control	1	30.0456	20.523	-0.549915	0.0002	0.0117098
HES1	NC_000003.12:194136141-194138612	Control	1	37.3534	25.6163	-0.544174	0.00115	0.0436419
SP6	NC_000017.11:47844907-47876312	Control	1	23.016	15.792	-0.543444	0.0006	0.027416
TCEAL9	NC_000023.11:103356451-103358469	Control	1	51.7985	35.5415	-0.543409	0.00135	0.048998
EHD2	NC_000019.10:47713343-47743134	Control	1	38.8931	26.6948	-0.542956	0.00085	0.0351483
SEPT8	NC_000005.10:132747401-132778216	Control	1	28.7375	19.784	-0.538598	0.00055	0.0257143
ACSS1	NC_000020.11:25006229-25058182	Control	1	49.5716	34.1489	-0.537673	0.00025	0.0139341

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
PRSS8	NC_000016.10:31131432-31135762	Control	1	106.917	73.6552	-0.537636	0.0004	0.020233
NPNT	NC_000004.12:105895439-105971671	Control	1	17.2811	11.9182	-0.536031	0.0006	0.027416
MYOM3	NC_000001.11:24042273-24112175	Control	1	18.9418	13.0826	-0.53393	0.0005	0.023902
ALDH1A1	NC_000009.12:72900661-72953317	Control	1	270.586	187.022	-0.532879	0.00045	0.0220627
CFTR	NC_000007.14:117478366-117668665	Control	1	30.5828	21.1908	-0.529286	0.0001	0.00676519
MUC13	NC_000003.12:124905441-124934751	Control	1	111.043	77.0679	-0.526911	0.0003	0.0161565
DTX4	NC_000011.10:59171429-59213021	Control	1	26.974	18.8042	-0.520512	0.0007	0.0307735
ORMDL3	NC_000017.11:39921040-39944999	Control	1	66.7645	46.9223	-0.508809	0.0008	0.0338484
MET	NC_000007.14:116672358-116798386	Control	1	64.835	91.8056	0.501809	0.0009	0.0363522
CAPN2	NC_000001.11:223677817-223776018	Control	1	62.1047	88.078	0.504079	0.0006	0.027416
FLNB	NC_000003.12:58008399-58172255	Control	1	35.3822	50.2714	0.506715	0.00065	0.0291442
FAM208B	NC_000010.11:5684758-5763740	Control	1	9.0796	12.9037	0.507086	0.00125	0.0466054
GNL3L	NC_000023.11:54530210-54567287	Control	1	4.38879	6.27392	0.515545	0.00135	0.048998
TIPARP	NC_000003.12:156673170-156706770	Control	1	21.6056	30.8953	0.515986	0.0005	0.023902
TUBGCP3	NC_000013.11:112485004-112606469	Control	1	18.1563	25.9917	0.517581	0.0013	0.0479098
ABLIM3	NC_000005.10:149141482-149260439	Control	1	15.4052	22.0566	0.517786	0.001	0.039516
SLC38A1	NC_000012.12:46183054-46278613	Control	1	31.7006	45.4161	0.518694	0.0005	0.023902
DYNC1H1	NC_000014.9:101964527-102050798	Control	1	10.9971	15.795	0.522346	0.00055	0.0257143
MDC1	NC_000006.12:30699806-30717988	Control	1	8.57787	12.3291	0.523379	0.00105	0.0410261
QSER1	NC_000011.10:32892825-33015362	Control	1	7.86245	11.3073	0.524203	0.0006	0.027416
COTL1	NC_000016.10:84565595-84618096	Control	1	86.746	125.36	0.531208	0.0005	0.023902
HSPH1	NC_000013.11:31134973-31171800	Control	1	95.5258	138.391	0.534789	0.0003	0.0161565
CENPF	NC_000001.11:214603180-214664574	Control	1	13.6763	19.8483	0.537333	0.0003	0.0161565
SMG1	NC_000016.10:18804852-18937762	Control	1	7.03782	10.3247	0.552893	0.00035	0.018209
MACF1	NC_000001.11:39084166-39487138	Control	1	7.79624	11.5076	0.561732	0.001	0.039516
UBASH3B	NC_000011.10:122655689-122814479	Control	1	5.85446	8.67076	0.566622	0.00055	0.0257143
PDCD11	NC_000010.11:103396614-103446295	Control	1	9.92578	14.7363	0.570127	0.00025	0.0139341
UCA1	NC_000019.10:15827044-15836321	Control	1	21.5547	32.0083	0.570442	0.00045	0.0220627
IFRD1	NC_000007.14:112423143-112477203	Control	1	19.8308	29.5633	0.576067	0.00015	0.00930899
CASC5	NC_000015.10:40594011-40664342	Control	1	4.25433	6.35903	0.579873	0.0008	0.0338484
ABHD2	NC_000015.10:89088149-89202360	Control	1	51.525	77.1508	0.582408	5.00E-05	0.00377623
PRRC2C	NC_000001.11:171485495-171593511	Control	1	11.8641	17.7661	0.582534	0.0001	0.00676519
HIST1H2BK	NC_000006.12:27138292-27146858	Control	1	91.7234	138.04	0.589724	0.00055	0.0257143
SLC7A5	NC_000016.10:87830021-87869499	Control	1	40.1707	60.8314	0.598671	5.00E-05	0.00377623
FAT1	NC_000004.12:186587782-186726915	Control	1	21.5312	32.6247	0.599539	5.00E-05	0.00377623
RBM19	NC_000012.12:113816737-113966371	Control	1	6.48083	9.85095	0.604083	0.0009	0.0363522
PLEC	NC_000008.11:143915146-143976800	Control	1	34.5739	52.555	0.604144	0.0003	0.0161565
ZNF532	NC_000018.10:58862599-58986480	Control	1	4.00508	6.13846	0.616046	0.00085	0.0351483
GPX3	NC_000005.10:151020437-151028993	Control	1	76.4555	117.28	0.617268	0.00035	0.018209
CENPE	NC_000004.12:103105805-103198409	Control	1	3.82639	5.8767	0.619022	0.0002	0.0117098

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
SRXN1	NC_000020.11:646614-658840	Control	1	30.0468	46.2045	0.620821	0.0001	0.00676519
SAT1	NC_000023.11:23783157-23786223	Control	1	57.4725	89.2414	0.634842	0.00015	0.00930899
MACC1	NC_000007.14:19918980-20217390	Control	1	3.83359	5.95788	0.636102	0.00015	0.00930899
ASPM	NC_000001.11:197084126-197146694	Control	1	6.49836	10.1728	0.646568	5.00E-05	0.00377623
GCLC	NC_000006.12:53497340-53545129	Control	1	19.5468	30.6011	0.646648	5.00E-05	0.00377623
CAD	NC_000002.12:27217256-27243792	Control	1	11.9642	18.8024	0.652195	5.00E-05	0.00377623
SVIL	NC_000010.11:29409533-29737001	Control	1	4.22766	6.65171	0.653866	0.00075	0.0322677
POLR1A	NC_000002.12:86026327-86106155	Control	1	8.23402	13.0577	0.665233	5.00E-05	0.00377623
XIST	NC_000023.11:73792204-73852753	Control	1	4.01727	6.37815	0.666923	5.00E-05	0.00377623
BRCA2	NC_000013.11:32315479-32399672	Control	1	2.37144	3.78941	0.676209	0.0002	0.0117098
FLNA	NC_000023.11:154348528-154374638	Control	1	47.1481	75.4522	0.678365	5.00E-05	0.00377623
PADI1	NC_000001.11:17205122-17246006	Control	1	4.83025	7.74372	0.680928	0.00115	0.0436419
LAMC2	NC_000001.11:183186038-183245127	Control	1	5.79284	9.29311	0.681889	5.00E-05	0.00377623
ECM1	NC_000001.11:150508010-150513789	Control	1	8.60927	13.818	0.682584	0.0011	0.0422045
PRKDC	NC_000008.11:47773107-47960183	Control	1	18.2133	29.3011	0.685964	5.00E-05	0.00377623
ANXA10	NC_000004.12:168092524-168199047	Control	1	71.0867	114.582	0.688722	5.00E-05	0.00377623
OSGIN1	NC_000016.10:83953221-83966332	Control	1	7.83294	12.742	0.701967	0.0006	0.027416
KLK6	NC_000019.10:50958630-50974726	Control	1	279.644	456.41	0.70674	5.00E-05	0.00377623
UTP20	NC_000012.12:101280126-101386619	Control	1	2.66149	4.35459	0.710301	0.00015	0.00930899
FTH1P8	NC_000023.11:148052011-148052923	Control	1	384.332	634.832	0.724022	5.00E-05	0.00377623
CAPRIN2	NC_000012.12:30709551-30754994	Control	1	5.58511	9.28973	0.734051	0.0001	0.00676519
STEAP1	NC_000007.14:89882352-90211635	Control	1	7.32351	12.1832	0.734289	0.0013	0.0479098
TRIB3	NC_000020.11:380628-397559	Control	1	49.9879	83.3197	0.737079	5.00E-05	0.00377623
ANXA3	NC_000004.12:78551587-78610451	Control	1	67.327	112.298	0.738081	5.00E-05	0.00377623
IGFBP6	NC_000012.12:53097502-53102344	Control	1	233.898	390.924	0.74101	5.00E-05	0.00377623
LAMA3	NC_000018.10:23689442-23955066	Control	1	5.5582	9.30027	0.742655	0.00015	0.00930899
FOSL1	NC_000011.10:65892135-65900526	Control	1	15.6126	26.2476	0.749474	5.00E-05	0.00377623
PSAT1	NC_000009.12:78297074-78330093	Control	1	33.8886	57.1143	0.753053	5.00E-05	0.00377623
FTH1P7	NC_000013.11:22695861-22696791	Control	1	278.407	469.48	0.753868	5.00E-05	0.00377623
GCLM	NC_000001.11:93885198-93909598	Control	1	7.56234	12.7603	0.754762	5.00E-05	0.00377623
FTH1	NC_000011.10:61946721-61967660	Control	1	1513.69	2566.73	0.761864	5.00E-05	0.00377623
FTH1P20	NC_000002.12:180692103-180916939	Control	1	213.278	364.241	0.772154	5.00E-05	0.00377623
FTH1P2	NC_000001.11:228644646-228746669	Control	1	729.33	1246.26	0.772961	5.00E-05	0.00377623
NTSR1	NC_000020.11:62708769-62762771	Control	1	36.9341	63.2743	0.776665	5.00E-05	0.00377623
FTH1P11	NC_000008.11:81458382-81590664	Control	1	125.139	214.441	0.777043	5.00E-05	0.00377623
NCR3LG1	NC_000011.10:17350438-17377321	Control	1	1.73002	2.97137	0.780344	0.00045	0.0220627
AREG	NC_000004.12:74445097-74455009	Control	1	94.8225	163.858	0.789142	5.00E-05	0.00377623
ZNF185	NC_000023.11:152898131-152973481	Control	1	6.25815	10.9363	0.805322	5.00E-05	0.00377623
KLK10	NC_000019.10:51012743-51020175	Control	1	112.97	199.079	0.8174	5.00E-05	0.00377623
PHLDA1	NC_000012.12:76025446-76031776	Control	1	21.4561	37.8855	0.820257	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
FTH1P10	NC_000005.10:17353712-17354631	Control	1	262.302	464.4	0.824142	5.00E-05	0.00377623
SNX29	NC_000016.10:11976733-12574289	Control	1	1.45527	2.59611	0.835058	0.00055	0.0257143
GPAT3	NC_000004.12:83535633-83605875	Control	1	5.18579	9.25374	0.835473	0.0001	0.00676519
SLC3A2	NC_000011.10:62856011-62888883	Control	1	90.8293	162.316	0.837579	5.00E-05	0.00377623
SYT13	NC_000011.10:45240301-45286333	Control	1	16.7085	30.2716	0.857379	5.00E-05	0.00377623
JAG1	NC_000020.11:10637683-10674046	Control	1	3.37782	6.18268	0.872143	5.00E-05	0.00377623
ASNS	NC_000007.14:97852116-97872542	Control	1	26.8663	50.2569	0.903525	5.00E-05	0.00377623
NEAT1	NC_000011.10:65422797-65445540	Control	1	49.8066	93.9126	0.914981	5.00E-05	0.00377623
LINC00941	NC_000012.12:30795680-30802711	Control	1	4.60581	8.74148	0.924423	0.00015	0.00930899
CD55	NC_000001.11:207321471-207360966	Control	1	55.2584	107.882	0.965191	5.00E-05	0.00377623
CXCL8	NC_000004.12:73740505-73743716	Control	1	2.66229	5.2031	0.966703	0.0008	0.0338484
DCBLD2	NC_000003.12:98795969-98901689	Control	1	43.0967	85.302	0.985002	5.00E-05	0.00377623
ADGRF1	NC_000006.12:46997702-47042363	Control	1	5.7863	11.5158	0.992905	5.00E-05	0.00377623
ADAM19	NC_000005.10:157477303-157575823	Control	1	3.73145	7.50494	1.00811	5.00E-05	0.00377623
CREB5	NC_000007.14:28299320-28825894	Control	1	0.854062	1.72839	1.01701	0.0001	0.00676519
IDS	NC_000023.11:149476989-149505354	Control	1	19.2406	39.0306	1.02045	5.00E-05	0.00377623
UPP1	NC_000007.14:48088307-48108746	Control	1	6.24553	13.0008	1.0577	0.0001	0.00676519
CEMIP	NC_000015.10:80779342-80989878	Control	1	13.475	28.1793	1.06435	0.0009	0.0363522
MAOB	NC_000023.11:43766609-43882475	Control	1	7.92471	16.6125	1.06784	5.00E-05	0.00377623
EMP1	NC_000012.12:13196667-13216774	Control	1	9.10301	19.2592	1.08114	5.00E-05	0.00377623
EREG	NC_000004.12:74365142-74388760	Control	1	14.0173	30.7124	1.13162	5.00E-05	0.00377623
ATF3	NC_000001.11:212565333-212620777	Control	1	7.15249	15.6884	1.13318	5.00E-05	0.00377623
CLIP4	NC_000002.12:29097675-29183813	Control	1	1.12211	2.48994	1.1499	5.00E-05	0.00377623
LOC400706	NC_000019.10:46057677-46077629	Control	1	1.72067	3.82709	1.15328	5.00E-05	0.00377623
DPYSL3	NC_000005.10:147234962-147510056	Control	1	0.531719	1.19051	1.16285	0.00105	0.0410261
PPP1R15A	NC_000019.10:48872391-48876062	Control	1	28.2211	64.6053	1.19488	5.00E-05	0.00377623
ITGB7	NC_000012.12:53191317-53207376	Control	1	3.12535	7.19698	1.20337	5.00E-05	0.00377623
PTPRM	NC_000018.10:7567315-8406861	Control	1	0.75628	1.74387	1.2053	5.00E-05	0.00377623
TNC	NC_000009.12:115019574-115118257	Control	1	0.940044	2.18187	1.21477	5.00E-05	0.00377623
CALB2	NC_000016.10:71358712-71392129	Control	1	48.0807	111.74	1.21661	5.00E-05	0.00377623
DUSP5	NC_000010.11:110497866-110511544	Control	1	5.87292	13.6776	1.21967	5.00E-05	0.00377623
CEACAM5	NC_000019.10:41708584-41730433	Control	1	1.81773	4.47708	1.30042	5.00E-05	0.00377623
CEACAM6	NC_000019.10:41755420-41772211	Control	1	8.10616	20.2106	1.31802	5.00E-05	0.00377623
GEM	NC_000008.11:94249248-94262345	Control	1	0.76245	1.9398	1.3472	0.0007	0.0307735
CHAC1	NC_000015.10:40942134-40956519	Control	1	4.4221	11.7389	1.40849	5.00E-05	0.00377623
SERPINB7	NC_000018.10:63753046-63805376	Control	1	0.495931	1.3731	1.46922	0.00125	0.0466054
ANKRD45	NC_000001.11:173500464-173705430	Control	1	0.457768	1.33013	1.53887	0.0002	0.0117098
SLC7A11	NC_000004.12:138025237-138242418	Control	1	5.73686	17.1413	1.57915	5.00E-05	0.00377623
CYP1A1	NC_000015.10:74719541-74725610	Control	1	0.523368	1.57134	1.5861	0.0002	0.0117098
CST1	NC_000020.11:23747552-23750937	Control	1	3.28017	10.02	1.61105	5.00E-05	0.00377623

Table S1: Continued

Gene	Locus	Sample 1	Sample 2	Value 1	Value 2	LogFC	p value	q value
AKR1C1	NC_000010.11:4963261-4979967	Control	1	8.39662	26.5198	1.65919	5.00E-05	0.00377623
LRRN4	NC_000020.11:6040545-6054080	Control	1	0.530669	2.1368	2.00957	5.00E-05	0.00377623
LOC105374003	NC_000003.12:98902008-99018562	Control	1	1.30775	5.51698	2.0768	5.00E-05	0.00377623
DHRS9	NC_000002.12:169067034-169096167	Control	1	0.938143	4.20271	2.16344	5.00E-05	0.00377623
SCEL	NC_000013.11:77535673-77645263	Control	1	2.62774	11.8339	2.17103	5.00E-05	0.00377623
SPRR1A	NC_000001.11:152984087-152985814	Control	1	1.2996	6.17345	2.24801	0.00015	0.00930899
AKAP12	NC_000006.12:151239814-151358559	Control	1	1.51284	7.63142	2.3347	5.00E-05	0.00377623
SPRR3	NC_000001.11:153001746-153003856	Control	1	0.656662	3.55751	2.43764	0.0002	0.0117098
HSPA6	NC_000001.11:161524539-161526897	Control	1	0.274954	1.51575	2.46277	5.00E-05	0.00377623
SPRR1B	NC_000001.11:153031202-153032900	Control	1	1.87231	21.7932	3.54099	5.00E-05	0.00377623

LogFC: Log2 of fold change

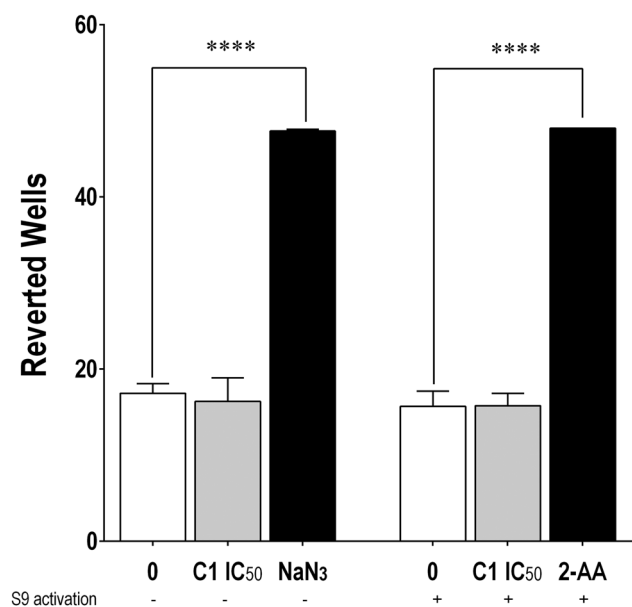


Figure S1: Compound 1 not cause a mutagenic effect. The data showed that the treatment with PCS-201-012 (4.59 μ M, more than three times IC₅₀ HT-29) does not induce mutagenic changes in TA100 with or without metabolic activation (S9 activation). Sodium azide (NaN₃) and 2-aminoanthracene (2-AA) were employed as positive control and DMSO was employed as a negative control. The results are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) of triplicate samples from three independent experiments ($n = 9$). Significant differences from the negative control are indicated by **** $p < 0.0001$.

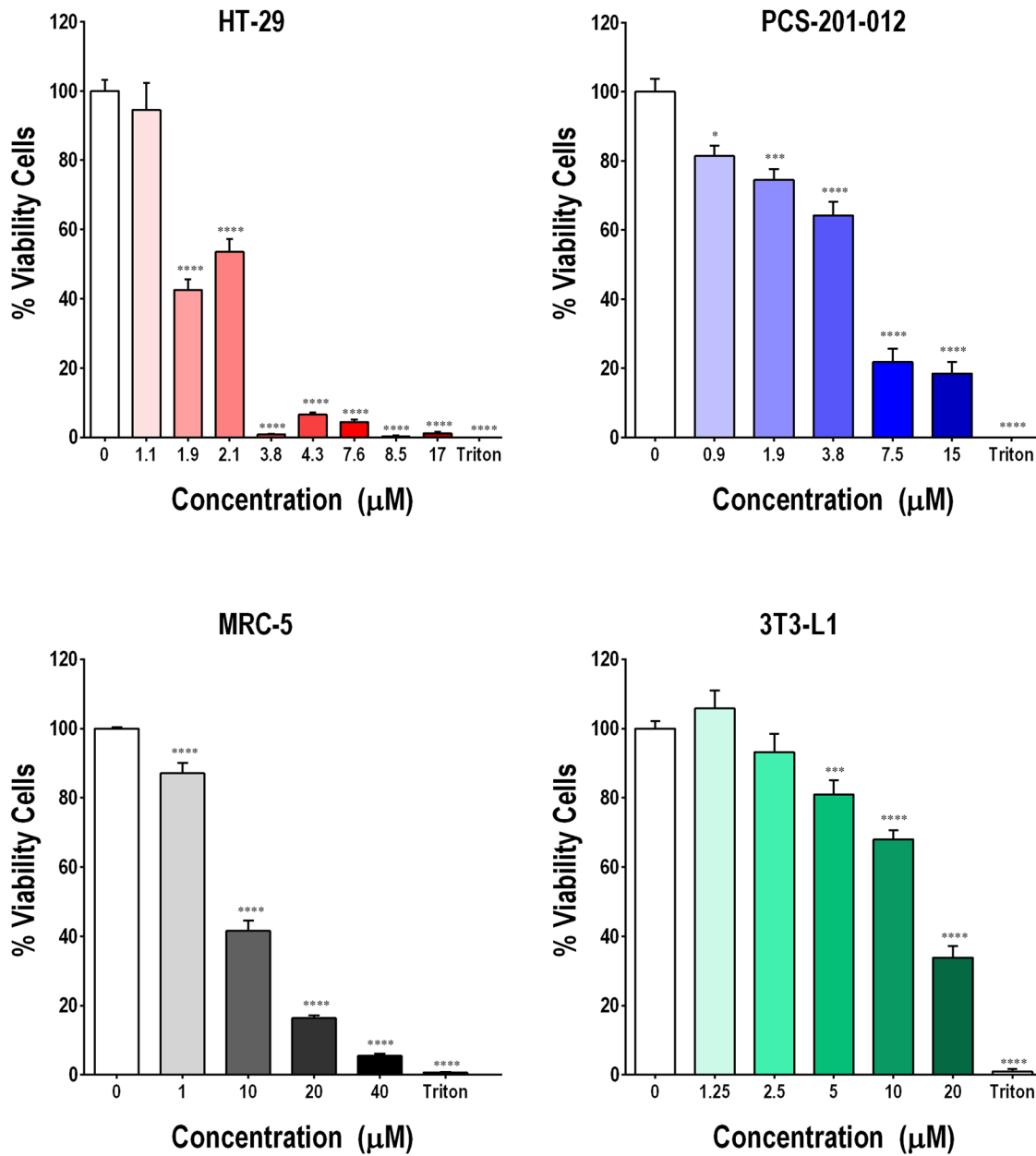


Figure S2: Effect of Compound 1 in the viability of HT-29, PCS-201-012, MRC-5, and 3T3-L1 cells (MTT assay). After 48 h of treatment with almost 5 different concentrations of compound 1 (0–40 µM). The values were plotted as viability cells (%) calculated as a relation of mean OD cells treated/mean control untreated cells OD \times 100. The results are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) of triplicate samples from three independent experiments ($n = 9$). Significant differences from the untreated control are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

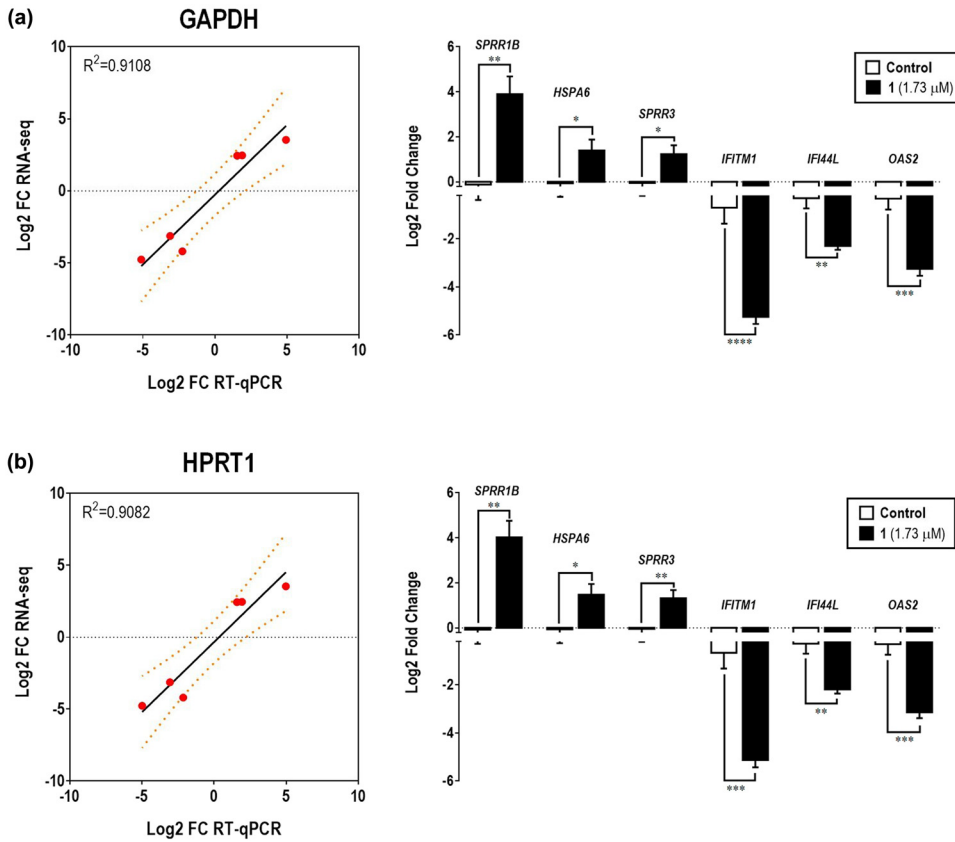


Figure S3: RT-qPCR validation of RNA-seq results. Six genes were selected to confirm the differential expression using the same samples used for RNA-seq ($n = 3$), together with independent biological replicates ($n = 3$) using RT-qPCR. Results were plotted as the correlation and linear regression analysis between RNA-seq and RT-qPCR data (Log2FC-fold change), in addition to the detailed results from the RT-qPCR analysis of selected genes when using (A) GAPDH or (B) HPRT as endogenous housekeeping genes. Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, as calculated by unpaired t -test with Welch's correction when required.

En la búsqueda de metabolitos bioactivos para tratar enfermedades crónicas no transmisibles, se han identificado diferentes fuentes naturales que, a lo largo de la historia, han sido proveedoras de fármacos que hacen parte de la terapia actual. Esta práctica se mantiene vigente y más aún, cuando se trata de desarrollar alternativas farmacológicas novedosas contra enfermedades como el cáncer que, si bien cuenta con una variedad de tratamientos, ninguno es curativo y su uso tiene serias consecuencias fisiológicas y psicológicas en el paciente que las utiliza. En esta tesis doctoral, abordamos las diferentes etapas de la obtención de sustancias con potencial terapéutico contra el cáncer, a través de la evaluación de extractos vegetales, fracciones enriquecidas en metabolitos secundarios y compuestos de síntesis orgánica, cuya fuente de obtención principal son las plantas medicinales de la Costa del Caribe Colombiano. En la primera etapa se evaluó la actividad citotóxica y anti-proliferativa de 31 extractos etanólicos totales obtenidos a partir de especies vegetales de la región, frente a las líneas de cáncer HT-29 (colorrectal), A549 y H292 (pulmonar), PC-3 (prostático), MDA-MB-231 (de mama), HeLa (cervical), utilizando el ensayo de reducción metabólica del MTT, obteniéndose para cada extracto activo, los valores de CI50. De los extractos evaluados, once (11) mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de al menos una línea celular de origen neoplásico, resaltándose dentro de este grupo, el extracto de *B. simaruba*, puesto que inhibió el crecimiento de todas las líneas neoplásicas a concentraciones bajas y, además mostró ser selectivo inhibiendo en menor proporción el crecimiento de líneas celulares normales (fibroblastos humanos fetales MRC-5 y fibroblastos murinos embrionales 3T3-L1). En la segunda etapa, evaluamos el potencial terapéutico de la fracción en diclorometano obtenida del extracto total de los cálices de *P. angulata* (PADF) utilizando modelos experimentales tanto in vitro como in vivo. Los resultados muestran que esta fracción enriquecida en ésteres de sacarosa, no solo posee actividad anti-inflamatoria como se reportó en estudios previos, sino que además posee actividad citotóxica y anti-proliferativa sobre células de cáncer colorrectal HT-29 mediante inducción de arresto celular en fase G2/M y apoptosis, inhibición de la migración celular, fragmentación del DNA, que producen daños irreversibles en la línea celular. Sumado a lo anterior, en el modelo in vivo de cáncer asociado a colitis (CAC, AOM/DSS), PADF redujo la carga tumoral, la severidad de la enfermedad y promovió la recuperación del tejido colónico, efectos asociados a la disminución de citoquinas pro-inflamatorias, proteína PCNA la cual está incrementada en procesos de inflamación y cáncer, aumento de la expresión de p38 (inductora de apoptosis) y MAPKs. La tercera etapa de la tesis estuvo enfocada a profundizar en el estudio de los mecanismos de acción asociados al efecto anti-proliferativo y citotóxico de dos (2) derivados quinoidales de origen natural obtenidos por síntesis orgánica, nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (avicequinone B) y [8-hidroxi-2-(2-tienilcarbonil)nafto[2,3-b]tiofen-4,9-diona] (AKM53); los cuales, en estudios previos, inhibieron el crecimiento de la línea celular HT-29, afectando en menor proporción el crecimiento de fibroblastos humanos normales dérmicos PCS-201-012. Los resultados obtenidos revelan que ambos compuestos disminuyen la capacidad de formación de colonias de células HT-29, inducen arresto en fase G2/M y necrosis. Además, el análisis de RNA sequencing (RNA-seq) mostró que la actividad biológica observada se encuentra relacionada con la reducción en la expresión de genes que actúan en vías de señalización de proliferación celular (JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT), así como inducción de ferroptosis como forma de muerte celular, expresión de miR-21 y estrés oxidativo en células de cáncer colorrectal HT-29.

Todos estos aportes científicos enriquecen el conocimiento disponible respecto a fuentes de metabolitos secundarios potencialmente útiles para tratar el cáncer, además, proporcionan un soporte científico al uso empírico y etnofarmacológico dado a estas especies vegetales. La fracción enriquecida (PADF) y los compuestos estudiados (avicequinone B y AKM53), podrían convertirse en un futuro no muy lejano, en coadyuvantes de utilidad en la terapia contra el cáncer, especialmente del cáncer colorrectal, contando con importantes avances en la elucidación de los mecanismos moleculares, pero aún se requieren estudios adicionales in vivo sobre su farmacocinética, farmacodinamia así como de diseño de formulación para poder acercarnos aún más a nuestro objetivo principal: la creación de un producto farmacéutico que pueda ser incluido en la terapia disponible contra el cáncer.

In the searching for bioactive metabolites to treat chronic non-communicable diseases, different natural sources have been identified that have been drug providers throughout history. This practice is valid when it wants to find new pharmacological alternatives to treat cancer, a disease with a defined therapy but associated with severe secondary effects that disturb the patient physiologically and psychologically. This doctoral thesis was conducted to approach the phases of cancer drug discovery by evaluating extracts, enriched fractions, and compounds whose primary source of obtaining are medicinal plants belonging to Colombian Caribbean flora. In the first stage, the cytotoxic and anti-proliferative activity of 31 total extracts were evaluated against a cancer cell line panel (HT-29, A549, H292, PC-3, MDA-MB-231, HeLa), using the MTT method. The results showed that 11 extracts affected the growth of at least one cancer cell line, being *B. simaruba* extract the most active and selective extract. The second stage evaluated the anti-cancer potential of dichloromethane fraction obtained of *P. angulata* total ethanolic extract (PADF) using in vitro and in vivo experimental models. The results showed that this fraction enriched in sucrose esters has cytotoxic and anti-proliferative activity against HT-29 cell line, inducing G2/M arrest, apoptosis, inhibition of cell migration, and DNA fragmentation that leads to irreversible damage compromises the cancer cell life. In the in vivo CAC model, PADF reduced the tumoral load, the severity of disease and promoted the regeneration of the colonic tissue. These effects were associated with reducing pro-inflammatory cytokines and PCNA protein, which is increased in inflammatory and cancer processes, and promoting the expression of p-38 proapoptotic protein and MAPKs. The third and final stage delves into the study of cytotoxic and anti-proliferative mechanisms of two synthetic compounds: Avicequinone B and AKM53, which in previous works showed a selective potent growth inhibitory activity against HT-29 colorectal cancer cell line. The results showed that both compounds diminished the capability of HT-29 colony formation, inducing G2/M arrest and necrosis. RNA-seq analysis showed that the compounds biological activity is linked with the reduction of expression of cell proliferation genes (JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT), ferroptosis induction, and oxidative stress and expression of miR-21.

These scientific contributions improved the knowledge concerning sources of secondary metabolites potentially useful to treat cancer, providing scientific support to empirical and ethnopharmacological use of the studied species. In the near future, PADF enriched fraction and studied compounds (avicequinone B and AKM53) could be coadjuvants in cancer therapy, especially in colorectal cancer, these compounds have molecular action mechanisms supported but require additional studies about the pharmacokinetic and pharmacodynamic effects as well as formulation design to get closer to the main objective: the generation of a pharmaceutical product that can be included in the available cancer therapy.