

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
DE PLANTAS**

**Aislamiento e identificación de metabolitos
bioactivos de *Colubrina greggii* y *Pentalinon
andrieuxii*, dos plantas nativas de la
Península de Yucatán**

**Tesis para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:**

QFB. Dafne Berenice Domínguez Carmona

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2010



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATA A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Aislamiento e identificación de metabolitos bioactivos de *Colubrina greggii* y *Pentalinon andrieuxii*, dos plantas nativas de la Península de Yucatán" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la Opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Para los efectos que sean necesarios,

Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

RECONOCIMIENTO

CICY

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Análisis e identificación de metabolitos bioactivos de *Colobium gorgolii* y *Passiflora arborescens*, dos plantas nativas de la Península de Yucatán", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Pérez Rodríguez, dentro de la Unidad de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Para los efectos que sean necesarios,



Dr. Oscar Alfredo Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN, A. C.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Dafne Berenice Domínguez Carmona

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez.

Las evaluaciones de actividad antiprotozoaria se realizaron en el laboratorio de del Dr. Alberto Giménez Turba de la Universidad Mayor de San Andrés en La Paz, Bolivia, y en el laboratorio del M. C. Manuel Jesús Chan Bacab de la Universidad Autónoma de Campeche.

Los experimentos sobre el receptor CXCR4 se realizaron en el Laboratorio de Biomoléculas e Innovaciones Terapéuticas del Dr. Jean-Luc Galzi, de la Facultad de Farmacia y Escuela Superior de Biotecnología de Estrasburgo (ESBS), Francia.

La colecta del material vegetal se realizó con el apoyo del técnico Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales, CICY.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto FOMIX-Yucatán (66262), los programas de colaboración del CYTED (Proyectos X.5 y RIBIOFAR), el proyecto Alfa "A chemical and computational approach to explore relevant biological processes by small-molecular probes obtained from natural sources (EULADIV)", Beca de Movilidad del CICY para estancias de investigación y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de dos Becas Mixtas para Estancias en el Extranjero [Bolivia (204971) y Francia(177004)] y una Beca para estudios de Doctorado (CONACYT-204975) a Dafne Berenice Domínguez Carmona.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por haber tomado el riesgo de aceptarme en su grupo de trabajo, gracias por las infinitas oportunidades de crecimiento académico y personal.

A los integrantes de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dr. Rogelio Pereda Miranda, Dr. Sergio Peraza Sánchez, Dr. Roberto Cedillo, Dr. Víctor Loyola Vargas, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Gumersindo Mirón López y Dr. Jean-Luc Galzi.

Al Dr. Alberto Giménez Turba y al Dr. Jean-Luc Galzi por aceptarme como parte de sus grupos de trabajo y ayudar en la realización de este proyecto.

Al M. C. Manuel Chan Bacab, a las Dras. Rosa Moo Puc, Muriel Hachet-Haas, Guilia Getti y Shirley Fairhurst, y a los Drs. Nigel C. Veitch, Patrick Gizzi, Bernard Bucher y Lionel Hill, por su ayuda en las evaluaciones y/o en la interpretación de los resultados, así como a la Q.B.B. Karline García Sosa, la Q.B.B. Fabiola Escalante Erosa, la Lic. Grace Ruiz Pinell, el M.C. David Gutiérrez Yapu y el Biol. Paulino Simá por su dedicación y el apoyo técnico prestado. A la A.I. Valerie Utard, quien me brindó su infinita ayuda y amistad.

A mis compañeros de laboratorio en México, Bolivia y Francia que estuvieron noche y día acompañándome durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Vicky, Jericó, Daniela, Carlos L., Carlos C., Rosalia, Cinthya, Gerardo, Jeany, Glendy, Eliana, Elie y Zhelmy por estar conmigo durante estos años; así como a Carolina, Erika, Ana, Abraham, Francisco, Roberto, Marina y Gustavo por enseñarme que la distancia acerca a las personas.

Un agradecimiento especial a Patrick por la confianza que depositó en mí.

A mi familia, Yolanda y Catalina quienes me enseñan día a día con el ejemplo lo que es perseverancia, a Gregorio por darme las herramientas para superar las adversidades, a mis hermanos Ajax y Axel quienes a

pesar de la distancia siempre están para apoyarme y a Emigdio, que me brinda fuerzas para seguir.

DEDICATORIA

No podemos resolver problemas pensando de la misma manera que cuando los creamos.

Albert Einstein

A mi familia...

THE DEPARTMENT OF AGRICULTURE
WASHINGTON, D. C.

1917

1917

ÍNDICE

Reconocimientos	i
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	v
Lista de figuras	xiii
Lista de cuadros	xvii
Lista de abreviaturas	xix
Resumen	xxi
Abstract	xxiii
INTRODUCCIÓN	1
REFERENCIAS	3
CAPÍTULO 1. Antecedentes	5
1.1 Las enfermedades persistentes y parasitarias	5
1.1.1 El cáncer	5
1.1.2 El VIH y SIDA	6
1.1.3 Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios	7
1.1.3.1 La leishmaniosis	7
1.1.3.2 La tripanosomiasis americana	8
1.1.3.3 La malaria	9
1.2 La medicina tradicional y los productos naturales	9
1.2.1 Los productos naturales como fuente de fármacos	10
1.2.2 Las plantas como fuente de productos naturales de importancia biológica	10
1.2.2.1 Biogénesis de los productos naturales en las plantas	10
1.2.3 Los productos naturales de plantas como agentes terapéuticos	13
1.3 Importancia del estudio	17
1.4 Objetivos	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos particulares	18
1.5 Estrategia experimental	19
1.6 Referencias	20

CAPÍTULO 2. Descripción taxonómica y conocimiento fitoquímico de *Pentalinon andrieuxii* (Müell. Arg.)

B.F.Hansen & Wunderlin y *Colubrina greggii* var.

<i>yucatanensis</i> M.C. Johnst	27
2.1 Introducción	27
2.2 <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müell. Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin	27
2.2.1 Descripción taxonómica de <i>P. andrieuxii</i> (Müell. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin	28
2.2.2 Distribución geográfica	29
2.2.3 Usos etnobotánicos	30
2.2.4 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica de la familia Apocynaceae	31
2.2.5 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica de género <i>Pentalinon</i>	32
2.3 <i>Colubrina greggii</i> S. Watson var. <i>yucatanensis</i> M.C. Johnst	33
2.3.1 Descripción botánica de <i>C. greggii</i> S. Watson var. <i>yucatanensis</i>	33
2.3.2 Distribución geográfica	34
2.3.3 Usos etnobotánicos	35
2.3.4 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica de la familia Rhamnaceae	35
2.3.5 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica del género <i>Colubrina</i>	36
2.4 Referencias	39

CAPÍTULO 3. Actividad leishmanicida de los extractos crudos y fracciones de partición de *Pentalinon andrieuxii*

Müell. Arg. y *Colubrina greggii* S. Watson **43**

3.1 Descripción del capítulo	43
3.2 Leishmanicidal activity of yucatecan medicinal plants on <i>Leishmania</i> species responsible for cutaneous leishmaniasis	44

3.2.1 Abstract	44
3.2.2 Introduction	45
3.2.3 Materials and methods	46
3.2.3.1 Plant material	46
3.2.3.2 Preparation of extracts and initial fractionation	47
3.2.3.3 Leishmanicidal activity assay	48
3.2.3.3.1 MTS assay	48
3.2.3.3.2 Optimization of MTS assay	48
3.2.3.4 <i>Leishmania</i> spp. parasites and cell lines	49
3.2.3.5 Statistical analysis	50
3.2.4 Results	50
3.2.5 Discussion	55
3.2.6 Acknowledgments	55
3.2.7 Literature cited	56
3.3 Información adicional	59
3.3.1 Materiales y métodos	59
3.3.1.1 Procedimientos generales	59
3.3.1.2 Obtención del extracto orgánico crudo y fraccionamiento inicial del extracto orgánico crudo	60

CAPÍTULO 4. Actividad antiprotozoaria del ácido betulínico y sus derivados

4.1 Descripción del capítulo	61
4.2 Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives	62
4.2.1 Abstract	62
4.2.2 Introduction	63
4.2.3 Materials and Methods	64
4.2.3.1 Plant material	64
4.2.3.2 Isolation of betulinic acid (1)	64
4.2.3.3 Preparation of betulinic acid derivatives	64
4.2.3.3.1 Betulinic acid acetate (2)	64
4.2.3.3.2 Betulonic acid (3)	65
4.2.3.3.3 Betulinic acid methyl ester (4)	65

4.2.3.4 Leishmanicidal assay	65
4.2.3.5 Trypanocidal assay	65
4.2.3.6 Antiplasmodial assay	66
4.2.4 Results and Discussion	66
4.2.5 Acknowledgements	69
4.2.6 References	70
4.3 Datos espectroscópicos del ácido betulínico y sus derivados semisintéticos	75
4.3.1 Ácido betulínico (1)	75
4.4.2 Acetato del ácido betulínico (2)	75
4.4.3 Ácido betulónico (3)	75
4.4.4 Ester metílico del ácido betulínico (4)	76

CAPÍTULO 5. Metabolitos de *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* y evaluación de su actividad antiprotozoaria y citotóxica

5.1 Descripción del capítulo	79
5.2 Metabolites from roots of <i>Colubrina greggii</i> var <i>yucatanensis</i> and evaluation of their antiprotozoan and cytotoxic activity	76
5.2.1 Abstract	80
5.2.2 Introduction	80
5.2.3 Results and discussion	82
5.2.4 Experimental	87
5.2.4.1 General Experimental Procedures	87
5.2.4.2 Plant material	87
5.2.4.3 Extraction of plant material and purification of crude extract	88
5.2.4.4 3-O-acetyl-ceanothic acid (1)	88
5.2.4.5 Ceanothic acid (2)	88
5.2.4.6 3-O-acetyl-dimethyl-ceanothate (3)	89
5.2.4.7 Dimethyl-ceanothate (4)	89
5.2.4.8. Ceanothenic acid (5)	89
5.2.4.9 Betulinic acid (6)	89

5.2.4.10 Discarine B (7)	90
5.2.4.11 Chrysophanein (8)	90
5.2.4.12 Chrysophanein peracetate (9)	90
5.2.4.13 Bioassays	90
5.2.4.13.1 Leishmanicidal assay	90
5.2.4.13.2 Trypanocidal assay	91
5.2.4.13.3 Antiplasmodial assay	91
5.2.4.13.4 Cytotoxicity assay	91
5.2.4.13.5 Antiproliferative assay	92
5.2.4.13.6 Statistical analysis	92
5.2.5 Acknowledgements	92
5.2.6 Support information	93
5.2.7 References	101
5.3 Principales características en los espectros de resonancia magnética nuclear del ácido 3-O-acetilceanoótico	106

CAPÍTULO 6. *Pentalinon andrieuxii* como fuente de metabolitos antagonistas a la asociación CXCL12/CXCR4

	111
6.1 Introducción	111
6.2 Materiales y métodos	113
6.2.1 Procedimientos generales	113
6.2.2 Purificación del extracto crudo de <i>P. andrieuxii</i> .	114
6.2.3 Ensayos sobre receptores	114
6.2.3.1 Unión de CXCL12-TR/EGFP-CXCR4 en tiempo real	114
6.2.3.2 Ensayo de internalización del receptor EGFP-CXCR4	115
6.2.3.2.1 Visualización de la internalización del receptor EGFP-CXCR4 por microscopía	115
6.2.3.2.2 Cuantificación de la internalización del receptor EGFP-CXCR4 empleando anticuerpos	116
6.2.3.3. Mediciones de segundos mensajeros	117
6.2.3.3.1. Movilización del calcio intracelular	117

6.2.3.3.2 Inhibición de la producción del adenosin monofosfato cíclico (AMPC)	117
6.3 Resultados y discusión	118
6.4 Referencias	134
CAPÍTULO 7. Conclusión general y perspectivas	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Principales rutas del metabolismo secundario.	12
Figura 1.2.	Productos naturales y derivados utilizados como fármacos.	14
Figura 1.3.	Agentes quimiopreventivos y sus derivados aislados de plantas.	15
Figura 1.4.	Principales productos naturales, derivados naturales y semisintéticos y productos sintéticos modelados de productos naturales, con actividad antimalárica	16
Figura 2.1.	<i>Pentalinon andreuxii</i> (Müell. Arg.).	29
Figura 2.2.	Distribución de <i>P. andreuxii</i> (Müell. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin	30
Figura 2.3.	Estructuras de algunos metabolitos bioactivos de la familia Apocynaceae.	32
Figura 2.4.	Tri-nor-sesquiterpenos obtenidos de la raíz de <i>P. andreuxii</i> .	33
Figura 2.5.	<i>Colubrina greggii</i> S. Watson var. <i>yucatanensis</i> M.C. Johnst.	34
Figura 2.6.	Distribución de las variedades de <i>C. greggii</i> S. Watson.	35
Figura 2.7.	Ejemplos de metabolitos obtenidos del género <i>Colubrina</i> .	37
Figura 2.7.	(cont.) Ejemplos de metabolitos obtenidos del género <i>Colubrina</i> .	38
Figure 3.1.	The effect of DCG-3A and TPZ-2A (5 µg/ml) on terminally differentiated THP-1 cells infected with <i>L. aethiopica</i> is reported.	54
Figure 4.1.	Structures of Betulinic acid (1), Betulinic acid derivatives (2-4) and betulin (5).	67
Figura 4.2.	Espectros de ¹ H-RMN de ácido betulínico y acetato del ácido betulínico	77
Figura 4.3.	Espectros de ¹ H-RMN de ácido betulínico y ester metílico del ácido betulínico	78
Figure 5.1.	Structures of the natural and semisynthetic	

	derivatives compounds from <i>C. greggii</i>	84
Figure 5.2.	Principal H-H COSY couplings and HMBC correlations 3-O-acetyl-ceanothic acid (1)	93
Figure 5.3.	TLC analyses of 3-O-acetyl ceanothic acid in the crude extract of root from <i>C. greggii</i> .	100
Figura 5.4.	Espectro de ¹ H-RMN del ácido 3-O-acetilceanótico.	106
Figura 5.5.	Ampliación del experimento H-H COSY del ácido 3-O- acetilceanótico.	107
Figura 5.6.	Ampliación del experimento HMBC del ácido 3-O-acetilceanótico.	108
Figura 5.7.	Ampliación del experimento HMBC del ácido 3-O-acetilceanótico.	109
Figura 5.8.	Espectro de ¹ H-RMN de la discarina B	110
Figura 6.1.	Porcentajes de inhibición de la unión de CXCL12-TR con el receptor EGFP-CXCR4 por efecto del extracto crudo y las fracciones semipurificadas de <i>P. andrieuxii</i> .	119
Figura 6.2.	Porcentaje de inhibición de la unión de la quimiocina CXCL12-TR con el receptor EGFP-CXCR4 por efecto de las fracciones PA-4A-4M.	120
Figura 6.3.	Porcentajes de Inhibición a diferentes concentraciones de la fracción PA-4K en la unión de la quimiocina CXCL12-TR con el receptor EGFP-CXCR4.	121
Figura 6.4.	Vía de transducción de señales inducida por la unión de CXCL12 al receptor CXCR4, relacionadas principalmente a la migración y la quimiotaxis; otros efectos incluyen la supervivencia, proliferación y transcripción celular.	122
Figura 6.5.	Observación por microscopia de fluorescencia del efecto del extracto crudo de <i>P. andrieuxii</i> (PA-1) y sus fracciones de purificación (PA-3A-3C, PA-4K) en la internalización del receptor EGFP-CXCR4 expresado en células HEK-293.	124
Figura 6.6.	Cuantificación porcentual de receptores EGFP-CXCR4	

	presentes en la membrana plasmática en presencia de las fracciones semipurificadas de <i>P. andrieuxii</i> (PA-3C, PA-4K y PA-4G).	126
Figura 6.7.	Evaluación de la fracción PA-4K sobre la movilización de calcio intracelular en células HEK-293 EGPF-CXCR4.	127
Figura 6.8.	Inhibición dosis dependiente en la producción de AMPc en células HEK-293 EGPF-CXCR4.	128
Figura 6.9.	Movilización de calcio intracelular por activación de quimiocinas en células HEK-293 EGPF-CXCR4 ó HEK-293 CCR5, en presencia de la fracción PA-4K.	129
Figura 6.10.	Inhibición de la movilización del calcio intracelular en células HEK-293 EGPF-CXCR4.	130
Figura 6.11.	Perfiles cromatográficos por HPLC en fase reversa de las fracciones PA-5C, PA-5D y PA-5F.	131
Figura 6.12.	Perfiles cromatográficos y co-cromatografía por HPLC en fase reversa de las fracciones PA-4K y PA-5D.	132

121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

LISTA DE CUADROS

Table 3.1.	List of plant extracts, fractions, and pure metabolites from Yucatecan plants.	51
Table 3.2.	Effect of 24-hr treatment with the plant extracts at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ on <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i> and <i>L. tropica</i> metacyclic promastigotes.	52
Table 3.3.	LD_{50} and RMP values extrapolated from probit analysis with logit transformation of dose-response data.	53
Cuadro 3.4.	Rendimientos de los extractos orgánicos crudos y las fracciones de partición líquido-líquido de las especies en estudio.	60
Table 4.1.	IC_{50} (μM) values of antiprotozoal activity of betulinic acid and derivatives.	68
Table 5.1.	Leishmanicidal, trypanocidal, antiplasmodial and cytotoxic activity [IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] of crude extract, fractions and pure compounds from <i>C. greggii</i> .	86
Table 5.2.	^{13}C and ^1H NMR data for the ceanothane compounds 3-O-acetyl ceanothic acid (1), acetyl-dimethyl ceanothate (3), dimethyl ceanothate (4) and ceanothenic acid (5) (ppm).	94
Table 5.2.	(Cont.) ^{13}C and ^1H NMR data for the ceanothane compounds 3-O-acetyl ceanothic acid (1), acetyl-dimethyl ceanothate (3), dimethyl ceanothate (4) and ceanothenic acid (5) (ppm).	95
Table 5.3.	^{13}C and ^1H NMR data for compounds 8 and 9.	97
Table 5.4.	^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for 7 in CD_3OD at 30 $^{\circ}\text{C}$ (400 MHz).	98
Table 5.5.	Cytotoxic activity [CC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] in HeLa, KB, HeP-2 and VERO cells of pure metabolites from <i>C. greggii</i> and semisynthetic derivatives.	99
Table 5.6.	Inhibition of the growth [IG_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] in HeLa, KB, HeP-2 and VERO cells of pure compounds isolated from <i>C. greggii</i> .	100

LISTA DE CUADROS

77	Figura 1.1. Evolución de la producción de leche en España (1980-1990)	1.1
78	Figura 1.2. Evolución de la producción de carne en España (1980-1990)	1.2
79	Figura 1.3. Evolución de la producción de huevos en España (1980-1990)	1.3
80	Figura 1.4. Evolución de la producción de miel en España (1980-1990)	1.4
81	Figura 1.5. Evolución de la producción de leche en Francia (1980-1990)	1.5
82	Figura 1.6. Evolución de la producción de carne en Francia (1980-1990)	1.6
83	Figura 1.7. Evolución de la producción de huevos en Francia (1980-1990)	1.7
84	Figura 1.8. Evolución de la producción de miel en Francia (1980-1990)	1.8
85	Figura 1.9. Evolución de la producción de leche en Alemania (1980-1990)	1.9
86	Figura 1.10. Evolución de la producción de carne en Alemania (1980-1990)	1.10
87	Figura 1.11. Evolución de la producción de huevos en Alemania (1980-1990)	1.11
88	Figura 1.12. Evolución de la producción de miel en Alemania (1980-1990)	1.12
89	Figura 1.13. Evolución de la producción de leche en Italia (1980-1990)	1.13
90	Figura 1.14. Evolución de la producción de carne en Italia (1980-1990)	1.14
91	Figura 1.15. Evolución de la producción de huevos en Italia (1980-1990)	1.15
92	Figura 1.16. Evolución de la producción de miel en Italia (1980-1990)	1.16
93	Figura 1.17. Evolución de la producción de leche en Reino Unido (1980-1990)	1.17
94	Figura 1.18. Evolución de la producción de carne en Reino Unido (1980-1990)	1.18
95	Figura 1.19. Evolución de la producción de huevos en Reino Unido (1980-1990)	1.19
96	Figura 1.20. Evolución de la producción de miel en Reino Unido (1980-1990)	1.20
97	Figura 1.21. Evolución de la producción de leche en Suecia (1980-1990)	1.21
98	Figura 1.22. Evolución de la producción de carne en Suecia (1980-1990)	1.22
99	Figura 1.23. Evolución de la producción de huevos en Suecia (1980-1990)	1.23
100	Figura 1.24. Evolución de la producción de miel en Suecia (1980-1990)	1.24

LISTA DE ABREVIATURAS

TLC	Thin layer chromatography <i>Cromatografía en capa delgada</i>
NMR	Nuclear magnetic resonance <i>Resonancia magnética nuclear</i>
COSY	Correlation spectroscopy <i>Espectroscopía de correlación</i>
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence <i>Correlación heteronuclear a simple cuanto</i>
DEPT	Distortionless enhancement of polarization transfer <i>Incremento sin distorsión por transferencia de polarización</i>
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation <i>Correlación heteronuclear a varios enlaces</i>
THP-1	Human acute monocytic leukemia cells <i>Células de leucemia monocítica aguda humana</i>
VERO	Green monkey kidney cells <i>Células de riñón de mono verde</i>
HEP-2	Human laryngeal carcinoma cells <i>Células de carcinoma laríngeo humano</i>
KB	Human nasopharyngeal carcinoma cells <i>Células de carcinoma nasofaríngeo humano</i>

HELA	Human cervical adenocarcinoma cells <i>Células de adenocarcinoma de cérvix humano</i>
HEK-293	Human embryo kidney transforms cells <i>Células transformadas de riñón de embrión humano</i>
GPCRs	G Protein Coupled Receptors <i>Receptores acoplados a proteínas G</i>
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer <i>Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia</i>
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein <i>Proteína verde fluorescente mejorada</i>
CXCL12-TR	Chemokine CXCL12 tagged to Texas red <i>Quimiocina CXCL12 unida a rojo Texas</i>
AMPc	Adenosin Monophosphate cyclic <i>Adenosin monofosfato cíclico</i>
PBS	Phosphate buffered saline <i>Amortiguador fosfato salino</i>
BFS	Bovine Fetal Serum <i>Suero fetal bovino</i>
BSA	Bovine Serum Albumin <i>Albumina sérica bovina</i>
SRB	Sulforhodamine B <i>Sulforodamina B</i>

RESUMEN

Las plantas son una fuente importante de moléculas de interés farmacológico. Recientemente, como resultado de un estudio de bioprospección de la flora endémica y nativa de la Península de Yucatán, se reportó que el extracto de las hojas de *Pentalimon andrieuxii* posee actividad leishmanicida y que el extracto de la raíz de *Colubrina greggii* posee actividad citotóxica y antiprotozoaria. Como una continuación de dicho estudio, los objetivos principales de este trabajo fueron el llevar a cabo la purificación biodirigida y la identificación de metabolitos bioactivos presentes en los extractos orgánicos crudos de *C. greggii* y *P. andrieuxii*.

La purificación de las fracciones bioactivas de *P. andrieuxii* condujo al aislamiento e identificación del ácido betulínico y el taraxasterol; en tanto que de *C. greggii* se obtuvo un nuevo producto natural identificado como ácido 3-O-acetilceanótico, junto con el ácido ceanótico, el ácido ceanoténico, la discarina B y la crisofaneína. La actividad antiprotozoaria del ácido betulínico muestra que este metabolito contribuye a la actividad antimalárica y tripanocida de las fracciones bioactivas de *P. andrieuxii* y *C. greggii*, pero no a la actividad leishmanicida. Sin embargo, los metabolitos aislados de *C. greggii* los ácidos 3-O-acetilceanótico y ceanoténico poseen una moderada actividad leishmanicida; estos últimos, al igual que la discarina B y la crisofaneína, poseen una baja actividad tripanocida.

Los estudios de estructura-actividad realizados con los ácidos betulínico y ceanótico, los dos triterpenos más abundantes, que permitieron establecer la importancia del grupo oxhidrilo en la posición C-3 y del carbonilo en la posición C-28, para la actividad antiprotozoaria. Los resultados obtenidos mostraron que las modificaciones en la posición C-3 de la estructura del ácido betulínico aumentan la actividad leishmanicida (e.g. acetato de ácido betulínico y ácido betulónico), mientras que las modificaciones en las posiciones C-3 o C-28 de todos los derivados probados, disminuyen la actividad tripanocida. Por otra parte, las modificaciones en C-3 y C-28 del ácido ceanótico demostraron que estos grupos no son esenciales para la expresión de actividad leishmanicida y tripanocida. Finalmente, las evaluaciones realizadas con la fracción de polaridad alta de los extractos de *P. andrieuxii*, así como en las fracciones semipurificadas, detectaron la presencia de metabolitos de naturaleza polar con actividad antagonista a la asociación CXCL12/CXCR4, y CCL5/CCR5. Estos resultados reflejan la importancia de *P. andrieuxii* como fuente de moléculas con actividad biológica sobre blancos terapéuticos novedosos y principalmente como inhibidores de la entrada del VIH.

ABSTRACT

Plants are an important source of molecules of pharmacological interest. Recently, as a result of a bioprospection study on the endemic and native flora from the Yucatan Peninsula as source of bioactive metabolites, it was reported that the leaf crude extract from *Pentalimon andrieuxii* possesses leishmanicidal activity and that the root crude extract from *Colubrina greggii* has cytotoxic and antiprotozoal activity. To continue with this study, the main objective of this work was to carry out the bioassay-guided purification and identification of bioactive metabolites in the crude organic extracts of *C. greggii* y *P. andrieuxii*.

Purification of the bioactive fractions led to the isolation and identification of betulinic acid and taraxasterol from crude extract of *P. andrieuxii*; while the crude extract of *C. greggii* yielded a new natural product identified as 3-O-acetylceanothic acid, together with ceanothic acid, ceanothenic acid, discarine B and chrysophanein. The antiprotozoan activity of betulinic acid showed that this metabolite contributes to the antiplasmodial and trypanocidal activities of the bioactive fractions from *P. andrieuxii* and *C. greggii*, but not to their leishmanicidal activity. However, the metabolites isolated from *C. greggii*, 3-O-acetylceanothic acid and ceanothenic acid, possess a moderate leishmanicidal activity and, together with discarine B and chrysophanein, have a weak trypanocidal activity.

Structure-activity relationship studies carried out on betulinic acid and ceanothic acid, the two most abundant triterpenes, allowed to establish the importance of the hydroxyl group at C-3 and of the carbonyl group at C-28, in the expression of leishmanicidal activity. Results showed that modifications in the C-3 position increased leishmanicidal activity (e.g. betulinic acid acetate and betulonic acid), while modifications of C-3 or C-28 in all derivatives tested, decreased the trypanocidal activity. Alternatively, modifications in C-3 or C-28 of ceanothic acid showed that these positions are not essential for the expression of leishmanicidal or trypanocidal activities. Finally, evaluations of the high polarity fraction from crude extracts of *P. andrieuxii*, together with the semipurified fractions, allowed to detect the presence of polar metabolites with antagonist activity to the association of CXCL12/CXCR4 and CCL5/CCR5. These results reflect the importance of *P. andrieuxii* as a source of molecules with biological activity towards novel therapeutic targets and, in particular, as inhibitors of the HIV entry.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los tratamientos para enfermedades de tipo emergentes, persistentes e infecciosas son deficientes. Asimismo, las enfermedades emergentes como el VIH/SIDA, han incrementado la persistencia de otras enfermedades como lo son las de tipo parasitario (WHO, 2002; Desjeux, 2000). Las enfermedades huérfanas como la leishmaniosis, tripanosomiasis y la malaria conjuntamente con la aparición de microorganismos patógenos resistentes a los medicamentos de primera línea, reflejan la importancia de desarrollar nuevos y más eficientes fármacos (Kayser *et al.*, 2002; WHO, 2004; Croft *et al.*, 2006).

Los productos naturales son la fuente más consistente y exitosa de moléculas líderes de uso farmacológico, ya que han provisto una mayor diversidad estructural que las moléculas obtenidas por la química combinatoria clásica (Harvey, 2000). Teniendo en cuenta que se han reportado 135,330 moléculas tan sólo de origen vegetal y que cuentan con 5,750 esqueletos diferentes (Cordell *et al.*, 2000), las plantas son una fuente potencial de moléculas bioactivas.

En la búsqueda de productos naturales novedosos de origen vegetal y con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, se ha utilizado como estrategia, estudiar a especies vegetales ubicadas en las regiones ricas en biodiversidad y que adicionalmente tengan información etnobotánica (Marcano *et al.*, 2002).

En México, con su extensa riqueza natural y cultural, existe un número importante de especies vegetales comúnmente utilizadas en la práctica de la medicina tradicional; sin embargo, hasta ahora, menos del 2% de las especies vegetales han sido estudiadas en relación con la producción de metabolitos bioactivos (Meckes *et al.*, 1993).

Como parte de un proyecto dirigido a la evaluación de la biodiversidad de la península de Yucatán como fuente de metabolitos bioactivos, se evaluaron en una serie de bioensayos, los extractos crudos de raíces, tallos y hojas de un grupo de plantas nativas de la península de Yucatán; los resultados de esta evaluación indicaron la presencia de actividad citotóxica y antiprotozoaria (leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica) en el extracto de raíz de *Colubrina greggii* (Vera-Ku, 2003).

y actividad leishmanicida en el extracto de hojas de *Pentalinon andrieuxii* (Chan-Bacab *et al.*, 2003).

El conocimiento fitoquímico de estas dos especies solamente incluye la presencia de la antraquinona antimicrobiana crisofanol en la especie *Colubrina greggii* (Rhamnaceae) (García-Sosa *et al.*, 2006) y de dos nor-sesquiterpenos con esqueleto novedoso de *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) pero sin actividad biológica (Yam-Puc *et al.*, 2009).

Debido al escaso conocimiento fitoquímico de *C. greggii* y *P. andrieuxii*, así como a la presencia de una interesante actividad biológica, se planteó como objetivo general en este trabajo, el aislamiento e identificación de los metabolitos bioactivos producidos por estas dos especies nativas de la península de Yucatán.

REFERENCIAS

- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Durán, R. and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andreuxii*. J. Ethnopharmacol., 86, 243-247.
- Cordell, G.A. (2000). *Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship*. Phytochemistry, 55, 463-480.
- Croft, S.L., Sundar, S. and A.H. Fairlamb (2006). *Drug Resistance in Leishmaniasis*. Clin. Microbiol. Rev., 19, 111-126.
- Desjeux, P. (2000). *Leishmania and HIV Co-infection in Southwestern Europe 1990–1999, Retrospective analysis of 965 cases*. World Health Organization, Geneva.
- García-Sosa, K., Villarreal-Alvarez, N., Lübben, P. and L.M. Peña-Rodríguez (2006). *Chrysophanol an antimicrobial anthraquinone from the root extract of Colubrina greggii*. J. Mex. Chem. Soc., 50, 76-78.
- Harvey, A. (2000). *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products*. Drug Discov. Today, 5, 294-300.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and S.L. Croft (2003). *Natural products as antiparasitic drugs*. Parasitol. Res., 90, S55-S62.
- Marciano, D. y M. Hasegawa (2002). *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela, pp. 54.
- Meckes, M., Mata, R. y X. Lozoya (1993). "La Investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana", en: *Investigación farmacológica de plantas medicinales*. Secretaría de Salud México.
- Vera-Ku, M. (2003). *Evaluación de la actividad biológica en plantas nativas de la península de Yucatán*. Tesis de Maestría. CICY, Mérida, México, pp. 145.
- World Health Organization (2002). *Informe sobre la epidemia mundial de HIV/SIDA*. Ginebra: UNAIDS/WHO
- World Health Organization (2004). *The global burden disease: 2004 update*. WHO Library Cataloguing-in-publication data, pp 10, 56.

Yam-Puc, J.A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M.P., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wendt, O.F., Sterner, O. and L.M. Peña-Rodríguez (2009). *Trinorsesquiterpenoids from the root extract of Pentalinon andrieuxii*. J. Nat. Prod., 72, 745-748.

CAPÍTULO 1

Antecedentes

1.1 LAS ENFERMEDADES PERSISTENTES Y PARASITARIAS

El cáncer es una de las enfermedades persistentes más conocidas, afecta al 13% de la población mundial y es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la tercera causa de muerte a nivel mundial (WHO, 2008). El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), junto con las enfermedades infecciosas y parasitarias (e.g. leishmaniosis, tripanosomiasis, malaria, etc.), se encuentran entre las diez principales causas que conducen a la pérdida de años de vida y muerte prematura (Hotez *et al.*, 2007). En México, los casos de cáncer causan el 12% de la mortalidad y aunque las enfermedades infecciosas y el SIDA muestran una baja tasa de mortalidad (0.6 y 0.8%, respectivamente; SSA, 2008), la persistencia de estas enfermedades las convierten en un problema serio para el sector salud, y para su solución se requiere de un trabajo integral entre las instituciones de salud, las universidades y los centros de investigación.

1.1.1 El cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades ocasionado por la proliferación continua de células anormales que afecta a 7.9 millones de personas en el mundo (Alberts *et al.*, 1999; WHO, 2008). En la lucha contra el cáncer, los tratamientos se han basado primordialmente en el uso de agentes citotóxicos; estos productos son poco selectivos y afectan tanto a las células cancerígenas como a las normales, ocasionando severos efectos adversos. El cáncer, junto con otros padecimientos relacionados con un proceso inflamatorio crónico como la artritis reumatoide, los procesos degenerativos asociados con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, se les ha relacionado con un estrés oxidativo persistente, entendido como la continua pérdida del balance entre las especies reactivas de oxígeno (ERO's; e.g. radicales superóxido, oxhidrilo y peróxido) y las defensas antioxidantes celulares (Ames *et al.*, 1993; Mates *et al.*, 2000). En la actualidad la quimioprevención, que consiste en la administración de agentes antioxidantes y antiinflamatorios que eviten estas condiciones, se ha adoptado como una estrategia para disminuir la

incidencia del cáncer y otras enfermedades relacionadas con el proceso inflamatorio crónico (Eskens & Verweij, 2000; Kinghorn *et al.*, 2004; Keit, 2009).

Recientemente se ha reconocido al receptor quimiocina CXCR4, como uno de los más importantes en la respuesta inflamatoria, ya que está implicado en el tráfico y reclutamiento de leucocitos en el sitio donde se libera su ligando endógeno, la quimiocina SDF-1 (factor derivado de células del estroma) ó CXCL12 (Murdoch, 2000). Asimismo, se ha reportado que las células malignas por lo menos 23 tipos de cáncer expresan el receptor CXCR4 y responden a CXCL12. Este receptor está involucrado en la migración directa de las células cancerígenas a los sitios de metástasis, incrementando la supervivencia de las células y su establecimiento (Balkwill, 2004; Slagsvold *et al.*, 2006), por lo que se ha sugerido que el receptor CXCR4 y la quimiocina CXCL12 pueden ser posibles blancos terapéuticos para el tratamiento del proceso metastásico (Zeelenberg *et al.*, 2003; Kucia *et al.*, 2004).

1.1.2 El VIH y SIDA

El SIDA, ocasionado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que infecta las células del sistema inmune, representa uno de los padecimientos más importantes de este siglo. En la actualidad existen 32 millones de personas viviendo con VIH/SIDA en el mundo. Se calcula que ocurren aproximadamente 13,700 nuevos casos por día y que cada año 2.2 millones de personas mueren por causas relacionadas a este padecimiento (WHO, 2008). En América Latina la cifra estimada de infectados de SIDA es de 1.5 millones (WHO, 2002). Hasta ahora, las terapias farmacológicas para el control del SIDA tienen como objetivo diferentes blancos en el ciclo de replicación del virus: 1) inhibidores de la entrada (e.g. T-20 y maraviroc); 2) antirretrovirales que pueden ser análogos de los nucleósidos (e.g. zidovudine), análogos nucleotídicos (e.g. tenofovir) y análogos no nucleosídicos (e.g. nevirapine); 3) inhibidores de la integrasa (e.g. raltegravir); 5) inhibidores de la proteasa (e.g. indinavir); y 6) inhibidores de la maduración (e.g. hidroxiurea). Cabe mencionar que una de las líneas de VIH-1 resistente a las drogas antivirales tiene tropismo X4, que está asociado con una rápida progresión de la enfermedad debido a la disminución en la cantidad de células T CD4+ y que utiliza como co-receptor, al receptor de quimiocina CXCR4 en linfocitos T y células permisivas. (Markowitz *et al.*, 2005; Vieillard *et al.*, 2008). La importancia del receptor CXCR4 en el desarrollo del VIH, igual que como se mencionó

anteriormente para el cáncer, lo sitúan como un importante blanco para la búsqueda de nuevos y más eficientes tratamientos para estos padecimientos (Tsutsumi *et al.*, 2006).

1.1.3 Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios

Las enfermedades parasitarias constituyen el grupo de enfermedades infecciosas más importantes de la humanidad, no sólo por su incidencia, sino también por su prevalencia (WHO, 2004). Dentro de este grupo de enfermedades podemos ubicar a las causadas por parásitos protozoarios como lo son la leishmaniosis, la tripanosomiasis y la malaria.

1.1.3.1 La leishmaniosis

La leishmaniosis es una de las enfermedades infecciosas más importantes en las zonas tropicales del mundo; este conjunto de enfermedades actualmente afecta a 12 millones de personas en 80 países del mundo y en México se reportaron 710 casos durante el año 2008 (WHO, 2010; SSA, 2008). Recientemente la leishmaniosis ha cobrado particular importancia, dada su asociación con el VIH; la coinfección *Leishmania*-VIH se ha reportado en 33 países y se estima que de 1.5 a 9% de los pacientes con SIDA pueden desarrollar leishmaniosis (Rosenthal *et al.*, 1995; Desjeux, 2000). Esta enfermedad es causada por un parásito protozoario flagelado del género *Leishmania* (familia Trypanosomatidae); los diferentes complejos de especies que producen leishmaniosis se han asociado a tres diferentes formas clínicas: visceral (complejo *Leishmania donovani*), mucocutánea, cutánea difusa o diseminada (complejo *Leishmania mexicana*) y cutánea (complejos *Leishmania tropica* y *Leishmania mexicana* en el Viejo Mundo y en América Latina, respectivamente). La enfermedad, de manera general, produce úlceras en la piel que pueden tardar en sanar (cutánea), o lesiones deformantes en las mucosas (mucocutánea), así como provocar lesiones en bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos (visceral). El parásito es transmitido por los vectores del género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo), los cuales se infectan al picar al hospedero vertebrado, ingiriendo sangre y la linfa que contiene amastigotes; el parásito pasa por el intestino del vector, transformándose hasta promastigotes metacíclicos infectivos que son transmitidos por la picadura a otro hospedero vertebrado sano. En el interior del hospedero, los promastigotes son fagocitados por las células mononucleares y pierden su flagelo, transformándose en amastigotes los cuales se multiplican hasta provocar lisis celular y la consecuente salida del microorganismo a células vecinas en donde se repite el proceso (Killick-Kendrick, 1990). Hasta ahora, y dado que

las vacunas contra la leishmaniasis aún están en desarrollo (Brandonisio & Spinelli, 2002), el control de la enfermedad radica en la farmacoterapia. La primera línea de terapia para este padecimiento se ha basado en el uso de compuestos antimoniales pentavalentes como el estibogluconato sódico (Pentostam®) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el número de cepas de *Leishmania* spp. resistentes a estos fármacos (Sundar *et al.*, 2001). La segunda línea de medicamentos incluye a la pentamidina (Pentacarinat®) y a la anfotericina B (Ambisome®), dos productos que causan efectos secundarios severos por su cardiotoxicidad y la alteración de la función renal y hepática. Recientemente, la miltefosina (Miltefosine®) ha sido aprobada como el primer fármaco de administración oral para la leishmaniasis. Sin embargo, el rango de recaída a la enfermedad es grande (Sundar & Murray, 2005) y en estudios *in vitro* se ha establecido que una mutación puntual en el parásito puede conducir a la resistencia a este fármaco (Perez-Victoria *et al.*, 2003).

1.1.3.2 La tripanosomiasis americana

La tripanosomiasis de América del Sur, conocida como la enfermedad de Chagas, es causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* y mundialmente afecta a 18 millones de personas; en México, durante el año 2008, se reportaron 679 casos (SSA, 2008). Esta enfermedad presenta tres estadios: a) fase aguda, en la que aparecen los primeros síntomas, la infección se expande y en la que ocurren cerca del 30% de las muertes; b) fase indeterminada, asintomática que puede durar varios años y c) fase crónica, cuando los parásitos invaden las células nerviosas y del corazón, causando la reactivación de la enfermedad y la muerte (Rodríguez-Morales, 2005). El *T. cruzi* es transmitido por hemípteros de la familia *Reduviidae* y en los últimos años las transfusiones se han convertido en una de las principales vías de transmisión de esta enfermedad (Pinto-Dias, 1992). El protozoario penetra en forma de tripomastigotes metacíclicos que invaden a las células del hospedero, particularmente macrófagos, donde se multiplican y proliferan como amastigotes, los cuales se diferencian a tripomastigotes cuando entran al torrente sanguíneo. Estos colonizan otras células (músculo y tejido neuronal) o son ingeridos por un insecto vector para comenzar de nuevo el ciclo (Brener, 1973). Los fármacos más comúnmente empleados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son los compuestos heterociclos nitrogenados como el benznidazol (Rochagan®) y el nifurtimox (Lampit®), ambos de limitada disponibilidad en algunas zonas consideradas como endémicas de la enfermedad y de limitada eficiencia (50%) para la cura de

pacientes en fase aguda (Rodrigues-Coura *et al.*, 2002). Hasta ahora no existen fármacos efectivos para el tratamiento de estados crónicos de la enfermedad y la única sustancia tripanocida usada para tratar la sangre en los bancos de sangre es el violeta de genciana cuyo uso es limitado por los efectos no deseados en los pacientes (Mafezoli *et al.*, 2000).

1.1.3.3 La malaria

La malaria es una enfermedad importante en las zonas tropicales de África, Asia y América del Sur. Aun cuando esta enfermedad es causada por cuatro especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), la mayoría de los casos son causados por *P. falciparum*; sin embargo, de los 2,357 casos reportados en México, todos se debieron a *P. vivax* (SSA, 2008). Estos parásitos son transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Anopheles* infectados. Una vez infectado el hospedero, los parásitos salen rápidamente de la circulación y se localizan en los hepatocitos en donde se transforman, multiplican y desarrollan hasta la forma de esquizontes tisulares (fase exoeritrocítica), los cuales se rompen para liberar miles de merozoitos que penetran en la circulación e invaden los eritrocitos (fase eritrocítica), donde se pueden encontrar las formas anulares, trofozoitos y esquizontes maduros. La reemergencia de la malaria como un problema de salud pública está ligada a la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a la quinina y otras fármacos de uso común como la cloroquina y la pirimetamina (Tracy *et al.*, 2000).

En síntesis, los tratamientos existentes para las enfermedades parasitarias mencionadas presentan serias desventajas al tener poca eficacia en estadios avanzados de la enfermedad, severos efectos adversos, la necesidad de supervisión médica para su administración, periodos largos de tratamiento, que suelen ser costosos y la reciente aparición de cepas resistentes a los tratamientos comunes (Murray, 2001). Por todo lo anterior es imperativa la búsqueda de nuevos y mejores fármacos para aliviar estas enfermedades.

1.2 LA MEDICINA TRADICIONAL Y LOS PRODUCTOS NATURALES

La medicina tradicional consiste en el conjunto de conocimientos, habilidades y prácticas basados en teorías, experiencias o creencias de las diversas culturas, que han sido usados en el mantenimiento de la salud, así como la prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades físicas y mentales. La OMS estima que el 80% de la población de países en

desarrollo basa el cuidado de su salud en la medicina tradicional en tanto que el 20% restante usa, en más del 25% de los casos, fármacos que han sido derivados de productos naturales (Farnsworth *et al.*, 1985).

1.2.1 Los productos naturales como fuente de fármacos

Los productos naturales, definidos como moléculas sintetizadas por una fuente biológica, representan una fuente comercial viable de fármacos y una alternativa importante para el desarrollo de nuevos y más eficientes tratamientos para enfermedades como el cáncer o las enfermedades infecciosas. Los productos naturales ofrecen una gran diversidad estructural y, por lo general, ocurren como moléculas de baja masa molecular (Müller *et al.*, 2000). La importancia de los productos naturales como nuevos fármacos o modelos para los mismos, es evidente si se tiene en cuenta que de los 1,184 productos que se incorporaron al mercado durante el periodo de 1981 a 2006, el 5% correspondió a productos naturales con estructuras novedosas, el 23% se obtuvo como derivados de éstos, el 10% correspondió a nuevas moléculas modeladas a partir de productos naturales y el 4% a moléculas de productos naturales obtenidos por síntesis química (Newman & Cragg, 2007).

1.2.2 Las plantas como fuente de productos naturales de importancia biológica

De las 300,000 especies de plantas superiores que se estima existen, únicamente el 10% han sido investigadas desde un punto de vista fitoquímico y/o farmacológico. Esto refleja el potencial de las plantas como productoras de metabolitos con estructuras novedosas y con propiedades farmacológicas importantes. Se considera que existen aproximadamente un millón de diferentes metabolitos pendientes de identificarse (Hostettmann, 2006). En México, que posee una flora medicinal extensa que incluye 7,000 especies de plantas en uso clasificadas botánicamente, el porcentaje de las especies estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y/o farmacológico es menor al 2% (Meckes *et al.*, 1993).

1.2.2.1 Biogénesis de los productos naturales en las plantas

Las plantas producen una vasta y diversa variedad de moléculas, que no parecen participar directamente en su crecimiento y desarrollo. Estas moléculas, conocidas como metabolitos secundarios, frecuentemente se encuentran distribuidas en un limitado grupo taxonómico. Las funciones de muchos de estos productos naturales continúan siendo desconocidas;

sin embargo, la producción de metabolitos secundarios es modificada por las interacciones de la planta con su entorno, como parte de sus mecanismos de protección y competencia, además de los procesos de polinización, simbiosis y detoxificación, entre otros (Croteau *et al.*, 2000). En la figura 1.1 se resumen las rutas biosintéticas que conducen a la producción de los diferentes grupos de metabolitos secundarios.

Los compuestos alifáticos presentan, en su mayoría, estructuras acíclicas poco ramificadas, las cuales se forman por condensaciones sucesivas de unidades de acetato-malonato. Dentro de éstos se agrupan los ácidos grasos y sus derivados que incluyen poliacetilenos, prostaglandinas y sus análogos, acetogeninas alifáticas entre otros. Los productos aromáticos incluyen derivados simples de benceno, anillos bencénicos condensados, monómeros, dímeros o polímeros de masa molecular elevada (e.g. ligninas y taninos) y generalmente presentan grupos oxigenados (e.g. flavonoides y sus derivados). Estos metabolitos se biosintetizan principalmente por dos vías: acetato-malonato (e.g. acetogeninas o policétidos) y ácido shikímico (e.g. fenilpropanos). Por otro lado, los terpenos son metabolitos con una amplia diversidad estructural dada la gran variedad de grupos funcionales que presentan y los diferentes números de carbonos que conforman sus esqueletos (e.g. monoterpenos, diterpenos, triterpenos, carotenoides, etc.); su origen biosintético es a partir de dos vías del metabolismo primario, la ruta del MVA (acetato/mevalonato) que se lleva a cabo en el citoplasma (Marcano *et al.*, 2002) ó de la nueva ruta MEP/DOXP (2C-metil-D-eritrol-4-fosfato/1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato) en los plástidos, que inicia con la condensación del gliceraldehído-3-fosfato y el piruvato para formar la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999). Finalmente, los alcaloides son moléculas que contienen nitrógeno en su estructura y su origen biosintético es variado (Figura 1.1), siendo sus precursores algunos aminoácidos (e.g. ornitina, lisina, triptófano, fenilalanina, tirosina), policétidos, unidades de prenilo, azúcares y bases purínicas y pirimidícas (Marcano *et al.*, 2002).

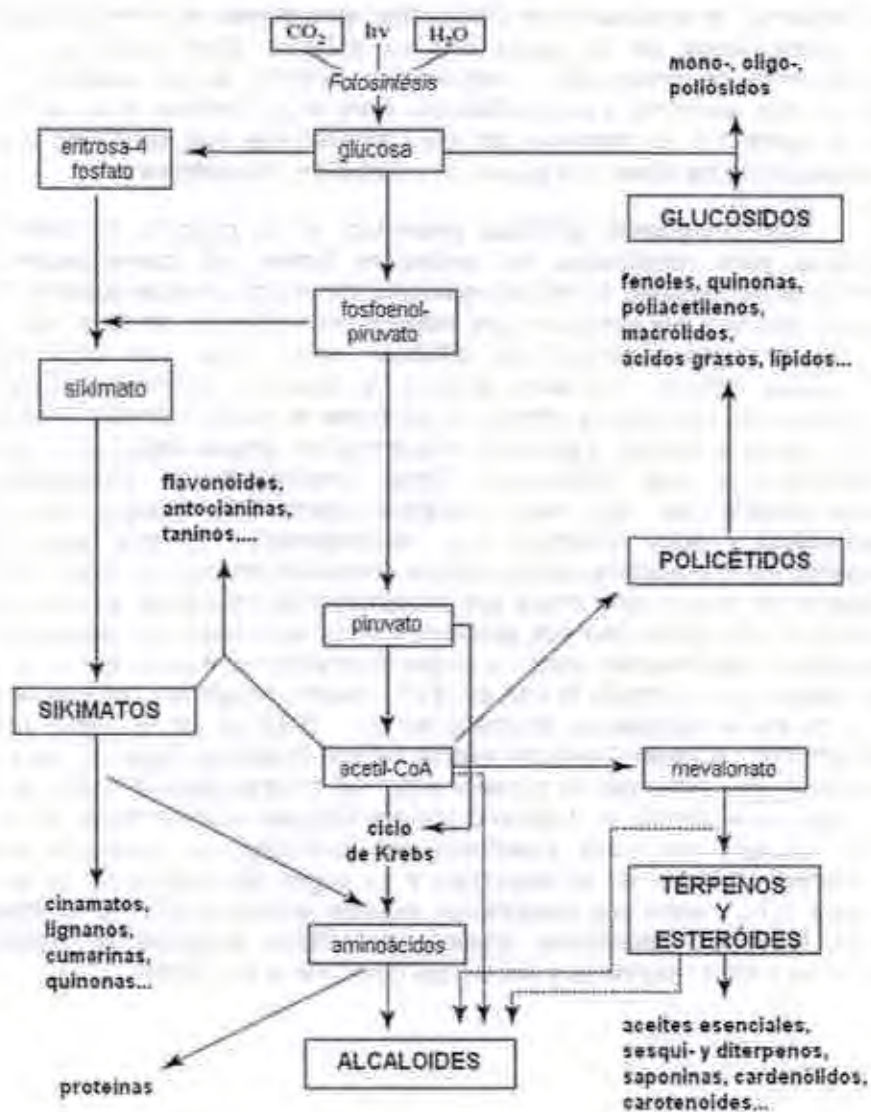


Figura 1.1. Principales rutas del metabolismo secundario. Traducido de Ikan *et al.*, (2008).

1.2.3 Los productos naturales de las plantas como agentes terapéuticos

El uso de las plantas como fuente de agentes terapéuticos incluye el aislamiento de metabolitos bioactivos de uso directo como fármacos, e.g. morfina, taxol, etc.; la generación de productos semisintéticos de alta actividad y/o baja toxicidad, e.g. metformina, nabilona, etc.; el uso de agentes como coadyuvantes en tratamientos farmacológicos, e.g. antioxidantes como el ácido ascórbico y los tocoferoles; y el uso de la planta completa o partes de la misma como remedio herbal, e.g. *Ginkgo biloba* (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Los primeros fármacos de origen vegetal incluyen a la aspirina, un derivado de la salicina (*Salix alba*, Salicaceae) empleado como antiinflamatorio, analgésico, antipirético y más recientemente como anticoagulante; la digoxina (*Digitalis purpurea*, Scrophulariaceae), usado como antiaritmico; la morfina (*Papaver somniferum*, Papaveraceae), principalmente usada como analgésico; y la pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*, Rutaceae), empleada en casos de glaucoma y xerostomía. En la actualidad, los ejemplos más importantes de fármacos de origen vegetal incluyen al taxol y a los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina (Figura 1.2), empleados en el tratamiento del cáncer (Evans, 2002).

Por otra parte, una de las estrategias para la prevención del cáncer ha consistido en el consumo de compuestos que disminuyan el estrés oxidativo (e.g. los tocoferoles, el ácido ascórbico y otros productos fenólicos), debido a que generalmente estos compuestos poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria (e.g. las isoflavonas). Dentro de estos compuestos quimiopreventivos de origen vegetal se encuentran metabolitos como la deguelina, el resveratrol, la bruceantina, la brassinina y la 4'-bromoflavona (Figura 1.3), entre otros, y que han demostrado actividad en modelos de inhibición de carcinogénesis *in vivo* y son moléculas prometedoras para el tratamiento de este padecimiento (Kingham *et al.*, 2004).

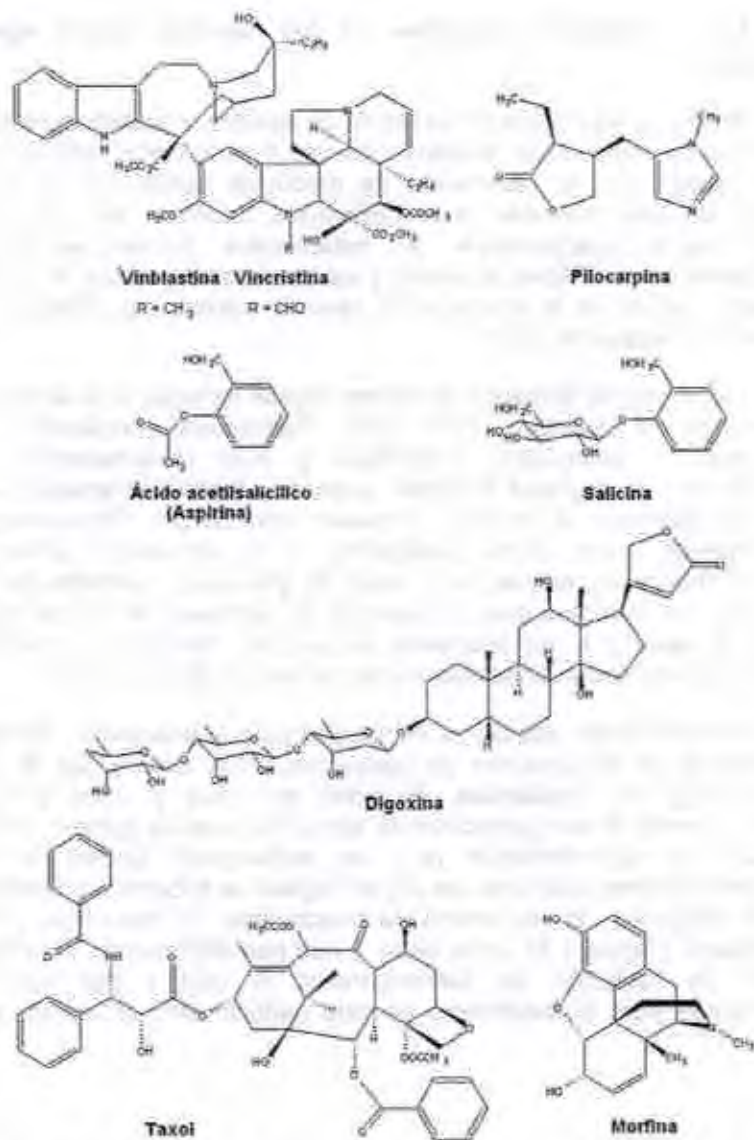


Figura 1.2. Productos naturales y derivados utilizados como fármacos.

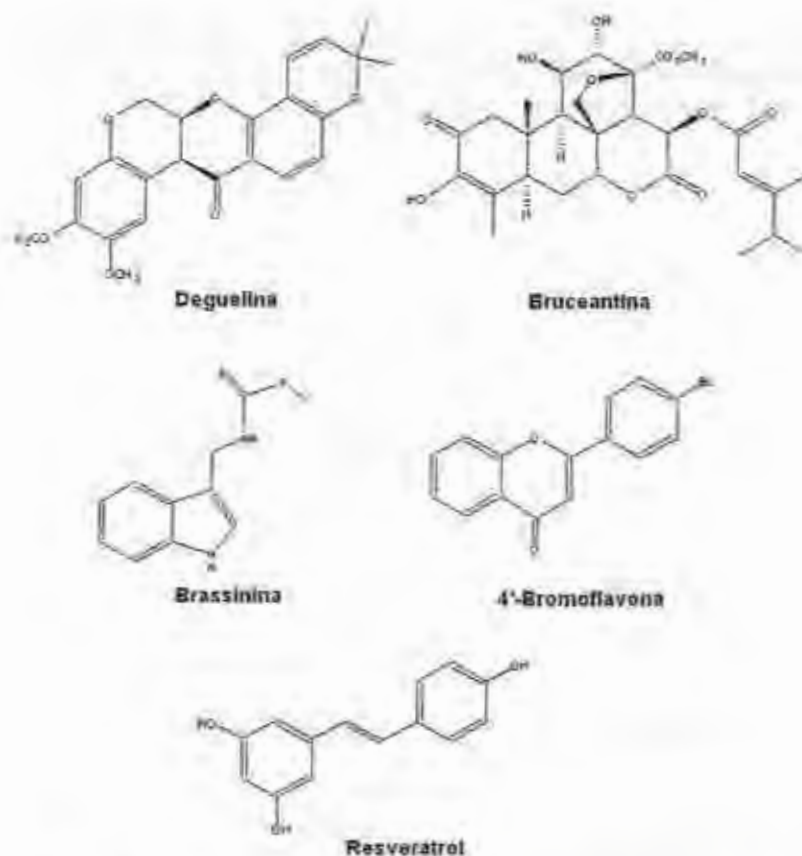


Figura 1.3. Agentes quimiopreventivos y sus derivados aislados de plantas.

Los metabolitos de origen vegetal con actividad contra parásitos protozoarios incluyen a quinonas, naftoquinonas, lignanos, neolignanos, alcaloides, chalconas y terpenos (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001; Kayser *et al.*, 2003). Entre los agentes antimaláricos (Figura 1.4), se encuentra la quinina (*Cinchona pubescens*), que ha sido un importante producto natural usado en esta patología (Evans, 2002), y la artemisinina (*Artemisia annua*), que junto con sus derivados semisintéticos y naturales como la dihidroartemisinina, el artemeter y el artesunato han demostrado una buena efectividad en el control de *P. falciparum* (Meshnick *et al.*, 1998). Recientemente, empleando bibliotecas de productos naturales en la

búsqueda de nuevos antimaláricos, se encontró que las espiroindolonas inhiben la síntesis de proteínas en *P. falciparum* y la optimización de estas moléculas resultó en la espiroindolona sintética NITD609, el cual es un probable candidato para pruebas clínicas (Rottmann *et al.*, 2010).

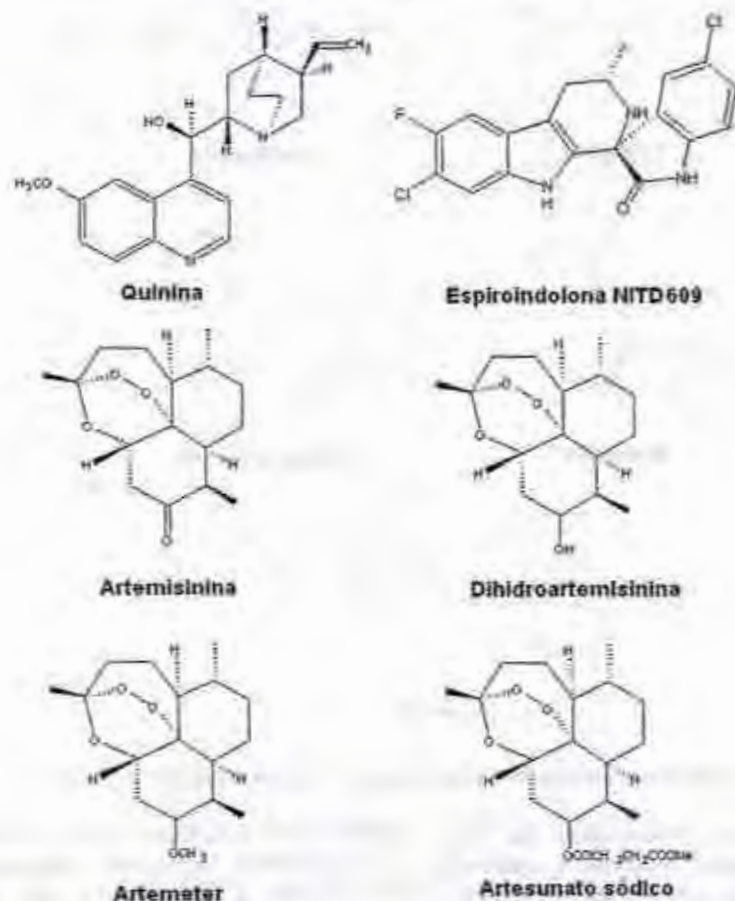


Figura 1.4. Principales productos naturales, derivados naturales y semisintéticos y productos sintéticos modelados de productos naturales, con actividad antimalárica.

1.3 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

México es uno de los doce países en las que se distribuye aproximadamente el 70% de las especies vegetales en el mundo (Myers *et al.*, 2000). La península de Yucatán cuenta con una gran diversidad de ecosistemas como los bosques perennes tropicales, selva baja caducifolia, pantanos tropicales y vegetación de sabana (Zarate-Hoyos, 1998), en los que las especies vegetales libran una batalla constante por su supervivencia, tomando en cuenta que las plantas, como organismos sésiles, se ven obligados a desarrollar una serie de defensas químicas para protegerse de las bacterias, insectos, hongos y, en algunos casos, de mamíferos (Fellows & Scofield, 1995).

Como parte de la extensa flora de la península de Yucatán, existen 168 especies consideradas como nativas o endémicas y cuasi-endémicas, cuyos estudios fitoquímicos y farmacológicos son limitados (Durán *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2001). Este grupo de plantas es de particular importancia si se tiene en cuenta que en la actualidad, las especies de distribución restringida o perteneciente a familias poco exploradas, son de particular interés para la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos.

En los últimos años, la acelerada tasa de la pérdida de los recursos bióticos se ha traducido indirectamente en la pérdida del acervo químico que le ha brindado al hombre un beneficio invaluable (McChesney *et al.*, 2007). Es por ello que actualmente se busca un beneficio dual entre la conservación de la biodiversidad y la búsqueda de productos naturales que puedan ofrecer un beneficio *a posteriori* (Moran *et al.*, 2001).

Como parte de un estudio de bioprospección realizado con la flora nativa de la península de Yucatán para la búsqueda de metabolitos bioactivos, se realizó la evaluación de diferentes tipos de actividad biológica en extractos de plantas consideradas como nativas de la península de Yucatán, encontrándose que los extractos de *Colubrina greggii* (Rhamnaceae) y *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae), dos especies comúnmente utilizadas en la medicina tradicional yucateca, representan dos fuentes importantes de metabolitos bioactivos. Mientras que el extracto de raíz de *C. greggii* mostró actividad anticancerosa y citostática, además de actividad antimalárica, actividad antimicrobiana y actividad tripanocida (Vera-Ku, 2003), el extracto orgánico de las hojas y raíz de *P. andrieuxii* mostró actividad contra parásitos de *Leishmania* spp. (Chan-Bacab *et al.*, 2003).

Dada la importancia de ambas especies como fuentes potenciales de metabolitos bioactivos de interés farmacológico, en este trabajo se plantea utilizar diferentes técnicas de bioensayo (e.g. detección de actividad antiprotozoaria, citotóxica, etc.) para llevar a cabo la purificación biodirigida de los metabolitos responsables de las actividades detectadas en los extractos de *C. greggii* y *P. andrieuxii*.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

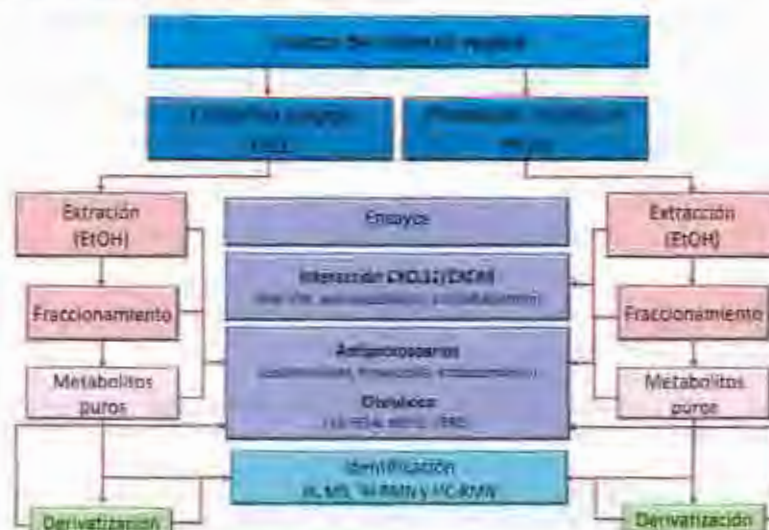
Llevar a cabo la purificación biodirigida y la identificación de metabolitos bioactivos presentes en los extractos orgánicos crudos de dos especies nativas de la península de Yucatán, *Colubrina greggii* y *Pentallnon andrieuxii*.

1.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer y estandarizar una estrategia de fraccionamiento para cada uno de los extractos orgánicos crudos.
- Llevar a cabo la purificación biodirigida de las fracciones bioactivas utilizando diferentes estrategias de fraccionamiento y técnicas cromatográficas de separación.
- Identificar las estructuras químicas de los productos obtenidos en forma pura, mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos y de los resultados de reacciones químicas de correlación.
- Evaluar el probable mecanismo o sitio de acción de los metabolitos bioactivos aislados.
- Realizar estudios de estructura-actividad.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se llevo a cabo la siguiente estrategia experimental:



En este trabajo se presenta, en el capítulo 2, la información taxonómica necesaria para la identificación de las especies *C. greggii* var. *yucatanensis* y *P. andrieuxii* así como su conocimiento fitoquímico. En el capítulo 3 se describe la obtención de los extractos orgánicos crudos de ambas especies, así como de las correspondientes fracciones de partición y de cuatro metabolitos puros, cuya actividad leishmanicida fue evaluada empleando diferentes cepas de *Leishmania* del viejo mundo. En el capítulo 4 se relata la preparación de diferentes derivados del ácido betulínico y la evaluación de su actividad antiprotozoaria (leishmanicida, tripanocida y antiplasmodica), en tanto que en el capítulo 5 se describe la purificación biotirrida de los componentes del extracto orgánico crudo de *C. greggii*, la identificación de los metabolitos obtenidos en forma pura y la evaluación de la actividad antiprotozoaria, citotóxica y citoestática de los diferentes productos. Finalmente, en el capítulo 6, se presentan los resultados de la evaluación del extracto crudo y de las fracciones de purificación de *P. andrieuxii* en los ensayos de unión y activación del eje celular CXCL12/CCR4. Las conclusiones generales y las perspectivas del trabajo se incluyen en el capítulo 7.

1.6 REFERENCIAS

- Alberts, A.S., Colvin, A.M., Conney, A.H., Ernster, V.L., Garber, J.E. and P. Grenwald (1999). *Prevention of cancer in the next millennium: Report of the chemoprevention working group to the American Association of Cancer Research*. Cancer Res., 59, 4743-4758.
- Ames, B.N. and M.K. Shigenaga (1993). "Oxidants are a major contributor to cancer and aging", in: *DNA and Free Radicals*. Halliwell B., Aruoma O.I. (eds). Chichester, UK: Ellis Horwood, pp. 1-15.
- Balkwill, F. (2004). *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4*. Seminars in Cancer Biol., 14, 171-179.
- Brandonisio, D. and R. Spinelli (2002). *Immune response to parasitic infections - an introduction*. Curr. Drug Target Immun. Endocr. Met. Dis., 2, 193-199.
- Brenet, Z. (1973). *Biology of Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol., 27, 347-382.
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Duran, R. and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andreuxii*. J. Ethnopharmacol., 86, 243-247.
- Chan-Bacab, M.J. and L.M. Peña-Rodríguez (2001). *Plant natural products with leishmanicidal activity*. Nat. Prod. Rep., 18, 674-688.
- Cleason, P. and L. Bohlín, (1997). *Some aspects of bioassay methods in natural products research aimed at drug lead discovery*. Trends Biotechnol. 15, 245-248.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and N.G. Lewis (2006). "Natural products (secondary metabolites)", in: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, Craft Print International Limited, Singapore, ch. 24, pp. 1250.
- Desjeux, P. (2000). *Leishmania and HIV Co-infection in Southwestern Europe 1990-1998, Retrospective analysis of 965 cases*. World Health Organization, Geneva.

- Durán, R., Campos, G., Trejo, J.C., Simá, P., May, F. y M. Juan (2000). *Listado florístico de la Península de Yucatán. Impresiones Profesionales del Sureste*. Mérida, Yucatán, México. pp. 99.
- Eskens, F. and J. Verweij (2000). *Clinical studies in the development of new anticancer agents exhibiting grow inhibition in models: Facing the challenge of a proper study designs*. *Oncol. Hematol.*, 34, 83-88.
- Evans, W.C. (2002). *Trease and Evans Farmacognosy*. W.B. Saunders & Co, London. 15th Ed, ch. 4, pp. 28-29.
- Farnsworth, N.R. (1985). *Medicinal plants in therapy*. *Bull. WHO.* 63, 965-981.
- Fabricant, D.S. and N.R. Farnsworth (2001). *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. *Env. Health Persp.*, 109, 69-75.
- Fellows, L. and A. Scofield (1995). "Chemical Diversity In Plants" In *Intellectual Property Rights and Biodiversity Conservation—An Interdisciplinary Analysis of the Values of Medicinal Plants*, T. Swanson (ed.), Cambridge University Press, New York, pp. 19-44.
- Hostettmann, K. (2006). *Apuntes, curso-taller de cribado de productos naturales*, Panamá, Panamá. CECID.
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sanchs, S.E., Sanchs J.D. and L. Savioli (2007). *Control of Neglected Tropical Diseases*. *N. Engl. J. Med.*, 357, 1018-27.
- Ikan, R. (2008). "The origin and the nature of the natural products", in *selected topics in the chemistry of natural products*. Ikan, R.(ed). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore, pp. 7.
- Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E. and M.J. Thun (2003). *Cancer statistics*. *Cancer J. Clin.*, 53, 5-26.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and S.L. Croft (2003). *Natural products as antiparasitic drugs*. *Parasitol. Res.*, 90, S55-S62.
- Keit, R.L. (2009). *Chemoprevention of lung cancer*. *Proced. Am. Thorax. Soc.*, 6, 187-193.

- Killick-Kendrick, R. (1990). *The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host*. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 65, 37-42.
- Kinghorn, A.D., Su, B.N., Jang, D.S., Chang, L.C., Li, D., Gu, J.Q., Carcache-Blanco, E.J., Pawlus, A.D., Lee, S.K., Park, E.J., Cuenden, M., Gills, J.J., Bhat, K., Park, H.S., Greenwood, E.M., Song, L., Jang, M. and J.M. Pezzuto (2004). *Natural inhibitors of carcinogenesis*. Planta Med. 70, 691-705.
- Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wysoczunski M., Bandura L., Allendorf, D.J., Zhang, J., Ratajczak, J. and M.Z. Ratajczak (2004). *CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion*. J. Mol. Histol., 35, 233-245.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., and M., Rohmer (1997). *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway*. FEBS Lett., 400, 271-274.
- Lichtenthaler H.K. (1999). *The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50, 46-65.
- Marcano, D. and M. Hasegawa (2002). *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela, pp. 29-34, 89-94, 117-119, 237-239, 379-382.
- Mafezoli, J., Vleira, P.C., Fernandes, J.B., Da, Silva, M.F.G.F. and S. Alburquerque (2000). *In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of Trypanosoma cruzi*. J. Ethnopharmacol., 73, 335-340.
- Markowitz, M., Mohri, H., Mehendru, S., Shet, A., Berry, L. and R. Kalyanaraman (2005). *Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report*. Lancet, 365,1031-1038.
- Mates, J.M. and F.M. Sanchez-Jimenez (2000). *Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 32, 157-170.

- McChesney, J.D., Venkataraman, S.K. and J.T. Henri (2007). *Plant natural products: Back to the future or into extinction?* Phytochemistry, 68, 2015-2022.
- Meckes, M., Mata, R. y X. Lozoya (1993). "La Investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana", en: *Investigación farmacológica de plantas medicinales*, Secretaría de Salud México.
- Meshnick, S.R., Taylor, T.E. and S. Kamchonwongpaisan (1996). *Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy*. Microbiol. Rev., 60, 301-315.
- Miranda, C.L., Aponso, G.L.M., Stevens, J.F., Deinzer, M.L. and D.R. Buhier (2000). *Prenylated chalcones and flavanones as inducer of quinone reductase in mouse heart 1C1C7 cell*. Cancer Lett., 149, 21-29.
- Moran, K., King, S.R. and T.J. Carlson (2001) *Biodiversity prospecting: Lessons and Prospects*. Annu. Rev. Anthropol., 30, 505-26.
- Müller, H., Brackhagen, O., Brunne, R., Henkel, T. and F. Reichel (2000). *Natural products in drug discovery*. Ernst Schering Res. Found. Workshop., 32, 205-216.
- Murdoch, C. (2000). *CXCR4: chemokine receptor extraordinaire*. Immunol. Rev., 177, 175-184.
- Murray, H.W. (2001). *Clinical and experimental advances in the treatment of visceral leishmaniasis*. Antimicrob. Agents Chemother., 45, 2185-2197.
- Newman, D.J. and G.M. Cragg (2007). *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. J. Nat. Prod., 70, 461-477.
- Myers, N., Mittermeyer, R.A., Mittermeyer, C.G., Fonseca, G.A.B. and J. Kent (2000). *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. Nature, 403, 853-858.
- Perez-Victoria, F.J., Castanys, S. and F. Gamarro (2003). *Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug*. Antimicrob. Agents Chemother., 47, 2397-2403.

- Pinto-Dias, J.C., (1992). "Epidemiology of Chagas disease", in: *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. Wendel, S., Brener, Z. Camargo, M.E., Rassi, A. (eds.), 22nd Congress of the International Society of Blood Transfusion, São Paulo, Brazil.
- Prochaska, H.J. and A.B. Santamaria (1988). *Direct measurement of NAD(P)H: quinine reductase from cell cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers*. Anal. Biochem., 169, 328-36.
- Raphael, Ikan (2008) "The origin and the nature of natural products", in: *Selected topics in chemistry of natural products*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp.1-7.
- Rodrigues-Coura, J. and S. L-de-Castro, (2002). *A critical review on Chagas disease chemotherapy*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97, 3-24.
- Rodríguez-Morales, A.J. (2005). *Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas*. Rev. Med. Perú Exp. Salud Pub. 22, 123-133.
- Rosenthal, E., Marty, P., Polzot-Martin, I., Reynes, J., Pratieng, F., Lafeuillade, A., Jaubert, D., Boulat, O. and J. Dereure (1995). *Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in Southern France*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89, 159-162.
- Sánchez-Medina, A., García-Sosa, K., May-Pat, F. and L.M. Peña-Rodríguez (2001). *Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in the Yucatecan traditional medicine. Part 1. Antioxidant, Antimicrobial, and β -glucosidase inhibition activities*. Phytomedicine, 8, 144-151.
- Secretaría de Salud (2008). Anuario de Morbilidad del CENAVECE. Revisado Junio 4, 2010 de <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- Slagsvold, T, Marchese, A, Brech, A. and H. Stenmark (2006). *C/CK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4*. EMBO J., 25, 3738-49.

- Sundar, S. (2001). *Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis*. Trop. Med. Int. Health., 6, 849-854.
- Sundar, S. and H.W. Murray (2005). *Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India*. Bull. WHO, 83, 394-395.
- Tracy, J.W. y L.T. Webster (2007). "Quimioterapia de infecciones causadas por protozoarios", en: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Goodman y Gillmans. McGraw-Hill, Cap. 40, pp. 1085-1088.
- Tsutsumi, H., Tanaka, T., Ohashi, N., Masuno, H., Tamamura, H., Hiramatsu, H., Araki, T., Ueda, S., Oishi, S. and N. Fujii (2006). *Therapeutic potencial of the chemokine receptor CXCR4 antagonist as multifunctional agents*. Peptide Science. 88, 279-289.
- Urbina, J.A., Payares, G., Contreras, L.M., Liendo, A., Sanoja, C., Molina, J., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P. and D. Loebenberg (1998). *Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: In Vitro and In Vivo Studies*. Antimicrob. Agents Chemother., 42, 1771-1777.
- Vera-Ku, M. (2003). *Evaluación de la actividad biológica en plantas nativas de la península de Yucatán*. Tesis de Maestría. CICY, Mérida, México. pp. 146.
- Vieillard, V., Habib, R.E., Brochard, P., Delache, B., Bovendo, H.F., Calvo, J., Morin, J., Picq, I., Martinon, F., Vasilin, B., Le Grand, R. and P. Debre (2008). *CCR5 or CXCR4 use influences the relationship between CD4 cell depletion, NKp44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques*. AIDS, 22, 185-192.
- World Health Organization (2002). *Informe sobre la epidemia mundial de HIV/SIDA*. Ginebra: UNAIDS/WHO
- World Health Organization (2010). *Leishmaniasis: Burden of Disease*. Retrieved September 12, 2010 from <http://www.who.int/leishmaniasis>
- World Health Organization (2004). *The global burden disease: 2004 update*. WHO Library Cataloguing-in-publication data, pp. 10, 56.

World Health Organization (2008). World Health Statistics 2008 update. WHO Library Cataloguing-in-publication data, pp. 13.

Zarate-Hoyos, G.A., (1998). "Markets and biodiversity in the Yucatan" in *Meeting of the Latin American Studies Association*, Palmer Home Hilton, Chicago, U.S.A., September 24-26.

Zeelenberg, I.S., Stalle, L.R.-V. and E. Ross (2003). *The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases*. Cancer Res., 63, 3833-3839.

CAPÍTULO 2

Descripción taxonómica y conocimiento fitoquímico de *Pentalinon andrieuxii* (Müell. Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin y *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* M.C. Johnst

2.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos importantes que requiere particular atención en la química de productos naturales, es la correcta identificación taxonómica del material vegetal en estudio. La escasa información sobre las plantas en cuanto a su uso tradicional, suele limitar la comparación intercultural de la utilización de las plantas en el tratamiento de diferentes enfermedades (Ankli *et al.*, 1999).

A continuación se presenta la descripción taxonómica y una revisión sobre el conocimiento fitoquímico de las especies *Pentalinon andrieuxii* (Müell. Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin y *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* M.C. Johnst.

2.2 *Pentalinon andrieuxii* (Müell. Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin

P. andrieuxii pertenece a la familia Apocynaceae, a la cual recientemente se le ha incluido la familia Asclepiadaceae y comprende aproximadamente 355 géneros y más de 3,700 especies (Endress & Bruyns, 2000).

La familia Apocynaceae se distribuye en zonas tropicales y subtropicales e incluye plantas arbóreas, arbustivas y herbáceas, a menudo trepadoras y algunas especies existen como lianas tropicales (Evans, 2002). Se clasifica en cinco subfamilias, una de las cuales, la subfamilia Apocynoideae, consta de cinco tribus, donde la *Echiteae*, que comprende aproximadamente 23 géneros, incluye al género *Pentalinon* (GRIN, 2007).

El género *Pentalinon* se encuentra conformado únicamente por dos especies, *P. andrieuxii* (*Urechites andrieuxii*, *Echites cupuliferus*) y *P. luteum* (*Vinca luteum*). Las especies de *Pentalinon* son lianas con tallos cilíndricos

en edad adulta, con secreción lechosa, glabros o pubescentes; sus hojas se encuentran opuestas, sin coléteres en el nervio central, las inflorescencias son cimosas, axilares, cáliz con cinco sépalos, corola amarilla o crema, limbo con cinco lóbulos, los frutos apocárpicos, foliculares, fusiformes, lisos, continuos, y sus semillas son numerosas, desnudas y comosas en el ápice micropilar (Morales, 2009).

2.2.1 Descripción taxonómica de *P. andrieuxii* (Müell. Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin

P. andrieuxii (Figura 2.1) es una liana con tallos glabros o puberulentos, sus hojas son elípticas (4.7-10.8 × 2.3-8.9 cm de ancho) con el ápice acuminado, la base obtusa, glabras o glabrescentes en el haz, glabras o esparcidamente puberulentas por el envés y un pecíolo de 0.9-2 cm de largo (Figura 2.1 a). Las inflorescencias son glabras o glabrescentes, pedicelos de 1.8-3.9 cm de largo, brácteas diminutas (ca. 1.5 mm de largo); sépalos ovados (4-6 mm de largo); corola verde-amarilla o amarilla, glabra, con la parte inferior del tubo 9-16 mm de largo y la parte superior tubular de 2.2- 4.4 cm de largo con 0.6-1.1 cm de diámetro en la fauce, la cual presenta lóbulos obovados (1.3-2.3 × 0.9-1.1 cm) y sus anteras son de 6-7 mm de largo (Figura 2.1 b). Adicionalmente, la floración ocurre entre los meses de agosto y noviembre. Los frutos son foliculares (14-30 cm × 5-8 mm) (Figura 2.1 c) con semillas de 1.5-1.9 cm de largo con presencia de comas de 1.2-2.7 cm de largo (Figura 2.1 d y e). *P. andrieuxii* se reconoce por sus brácteas florales diminutas, corolas con la parte inferior más larga (9-16 mm vs. 6-8 mm) y semillas más grandes en comparación con *P. luteum* (Woodson, 1936; Morales, 2009).



Figura 2.1. *Pentelinon andreuxii* (Müell. Arg.). a, laminas foliares opuestas; b, inflorescencia con corola alargada; c, frutos foliculares; d, semilla con coma y e, longitud de semilla.

2.2.2 Distribución geográfica

La distribución geográfica de *P. andreuxii* en el continente americano abarca desde Florida en los Estados Unidos hasta México y de las Antillas hasta el norte de Colombia. En México se encuentra distribuida por la vertiente del Pacífico desde el estado de Michoacán, hasta el estado de Chiapas y en la vertiente del Golfo de México abarca los estados de Veracruz, Quintana Roo y Yucatán (Figura 2.2). Esta especie es parte de la vegetación de la selva mediana y alta subperenifolia por lo que se encuentra en bosques secos y bordes de manglares, en elevaciones de 0-500 m. Adicionalmente, se le conoce con los nombres comunes de cantibteac, viperol bejuco, bejuco guaco o contrahierba (Woodson, 1936, Morales, 2009).



Figura 2.2. Distribución de *P. andrieuxii* (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin. Los cuadros negros indican la distribución de la especie. Tomado de mapas de distribución del Missouri Botanical Garden para *P. andrieuxii* (http://mobot1.mobot.org/webste/print_map.asp?url=http://mobot1.mobot.org/output/earth2_MOBOT1225612081850.jpg&name=Pentallnon andrieuxii).

2.2.3 Usos etnobotánicos

P. andrieuxii es una planta usada en la península de Yucatán para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea localizada. La medicina tradicional maya recomienda lavar las lesiones con una infusión de raíz y después aplicar la raíz pulverizada sobre el área afectada o la aplicación directa de las hojas secas y molidas en las lesiones (Chan-Bacab *et al.*, 2003). Otros usos incluyen el tratamiento de mordeduras de serpientes, para lo que se recomienda masticar la raíz o las hojas frescas y aplicarlas a manera de cataplasma en la mordedura. El látex también se utiliza para aliviar el dolor de cabeza y los disturbios nerviosos (Argüeta *et al.*, 1994; Pulido & Serralta, 1993).

2.2.4 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica de la familia Apocynaceae

Los estudios fitoquímicos de especies medicinales pertenecientes a la familia Apocynaceae reportan la presencia de alcaloides y glucósidos de importancia farmacológica; siendo los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina, los metabolitos más importantes de *Catharanthus roseus*, usados en el tratamiento del cáncer. Asimismo, la reserpina de *Rauvolfia serpentina* ha sido usada como antihipertensivo aunque con considerables efectos adversos (neurotoxicidad, citotoxicidad y depresión) (Figura 2.3a; Evans, 2002). Adicionalmente, se han reportado otros alcaloides como la ramiflorina A y B (Figura 2.3b) de *Aspidosperma ramiflorum*, los cuales poseen actividad contra promastigotes de *Leishmania amazonensis* y *L. braziliensis* (Piloto *et al.*, 2004) así como el alcaloide coronaridina (Figura 2.3c) de *Peschiera australis* con actividad leishmanicida (Delorenzi *et al.*, 2001). Por otro lado, los alcaloides isoschizogalina y 6,7-dehidro-19 β -hidroxilischizozina de *Schizogyne coffaeoides* y los iridoides plumericina e isoplumericina (Figura 2.3d) obtenidos de *Allamanda cathartica* L., poseen actividad antifúngica (Kariba *et al.*, 2002; Abdel-Kader *et al.*, 1997). Algunos productos antifúngicos e inhibidores de la biosíntesis de esteroides han mostrado ser una fuente promisoría de fármacos contra *T. cruzi* en modelos experimentales (Urbina, 1998). Si bien el conocimiento fitoquímico de la tribu Echiteceae es limitado, para el género *Echites* se ha descrito la presencia de cardenólidos y alcaloides pirrolizidínicos con actividad antitumoral y hepatotóxica (Tillequin *et al.*, 1993), así como actividad antiinflamatoria y sedante (Chan *et al.*, 2003).

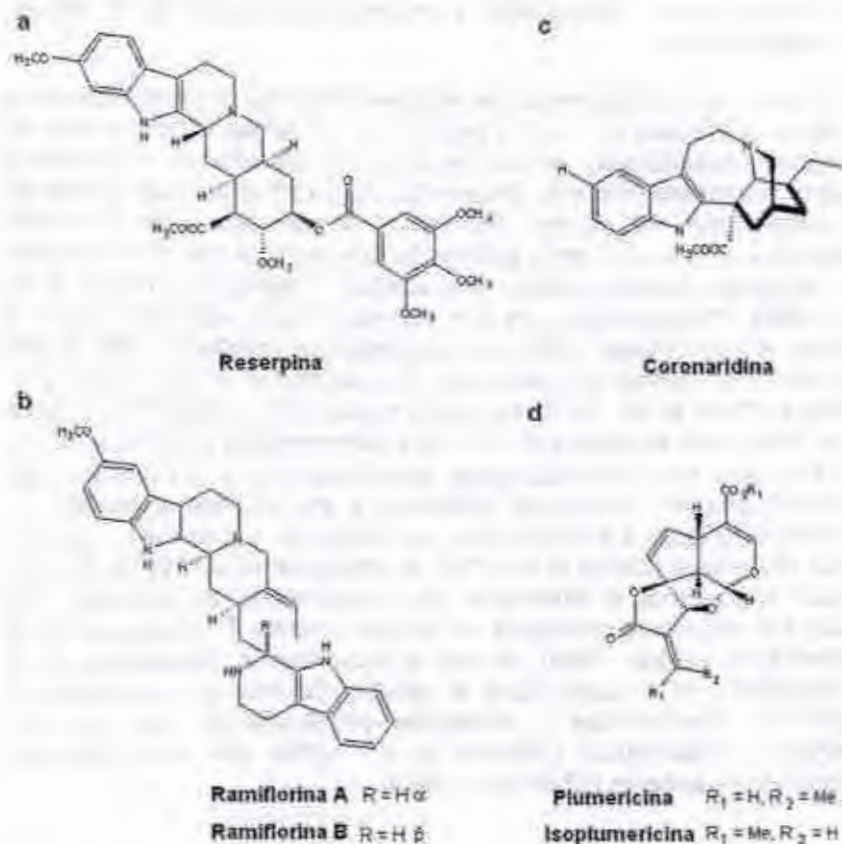


Figura 2.3. Estructuras de algunos metabolitos bioactivos de la familia Apocynaceae.

2.2.5 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica del género *Pentalinon*

El conocimiento fitoquímico del género *Pentalinon* únicamente incluye la presencia de urechitales A y B obtenidos del extracto de la raíz de *P. andrieuxii*, los cuales presentan estructuras químicas novedosas (Figura 2.4; Yam-Puc, 2009).

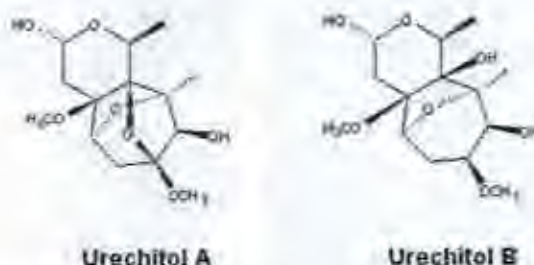


Figura 2.4. Tri-nor-sesquiterpenos obtenidos de la raíz de *P. andrieuxii*.

2.3 *Colubrina greggii* S. Watson var. *yucatanensis* M.C. Johnston

Colubrina greggii pertenece a la familia Rhamnaceae que consta de 59 géneros y cerca de 900 especies. Son plantas cosmopolitas y usualmente son árboles o arbustos. El género *Colubrina* comprende cerca de 31 especies incluyendo *C. greggii* que presenta tres variedades: *C. greggii* var. *greggii*, *C. greggii* var. *angustior* y *C. greggii* var. *yucatanensis* (Johnston *et al.*, 1971).

2.3.1 Descripción botánica de *C. greggii* S. Watson var. *yucatanensis*

C. greggii S. Watson var. *yucatanensis* (Figura 2.5) es un arbusto que oscila entre 1 y 5 m de altura, con ramas delgadas, glabras o tomentosas; hojas alternas, láminas ovadas a lanceoladas, con ápice agudo o acuminado, base truncada, margen aserrado-glandular, haz hirsutado a pubescente (Figura 2.5 a). Las inflorescencias se presentan en tirso con 15 a 40 flores de 15-30 mm de longitud, sépalos verdosos deltados, pubescentes dorsalmente y florece en los meses de marzo a junio (Figura 2.5 b). Su fruto es ligeramente tricoco de 8-10 mm de largo, casi esférico, con semillas negras, oblongas, comprimidas, lustrosas y el endospermo tan grueso como los cotiledones (Fernández, 1986). Esta variedad se diferencia de las otras por tener una mayor amplitud en el centro de las láminas foliares con un ángulo agudo apical de 35 a 90°, así como de la presencia de dientes marginales en las hojas (Figura 2.5 c) (Johnston *et al.*, 1971).



Figura 2.5. *Colubrina greggii* S. Watson var. *yucatanensis* M.C. Johnst. a, láminas foliares; b, inflorescencias en tirsos; c, dientes marginales en las hojas.

2.3.2 Distribución geográfica

C. greggii var. *yucatanensis* se distribuye desde el estado de Texas, EUA hasta Guatemala (Figura 2.6) y crece a una altitud de 300 a 1,600 m. Su distribución es de matorral xerófilo, de bosque tropical caducifolio y de encinares contiguos. Se conoce con los siguientes nombres comunes: Pujuche', china may, guayal, guayol, guayul, manzanita, pimienta ché, latuán, trampillo, trompillo y vara prieta (Fernández, 1986). *C. greggii* var. *yucatanensis* se encuentra en Guatemala y México; en este último es abundante en algunas partes de Yucatán y se encuentra también cerca de la Laguna de Chichankanab (Johnston *et al.*, 1971).



Figura 2.6. Distribución de las variedades de *C. greggii* S. Watson. *C. greggii* var. *yucatanensis* (círculos llenos), *C. greggii* var. *greggii* (círculos vacíos) y *C. greggii* var. *angustior* (círculos medio llenos). Tomado de Johnston *et al.*, (1971).

2.3.3 Usos etnobotánicos

C. greggii se usa como remedio contra abscesos y en enfermedades como el asma, la disentería, enfermedades del hígado, en granulaciones de párpados, en la tuberculosis, ulceraciones de la piel, como emoliente y antitusivo (Fernández, 1986).

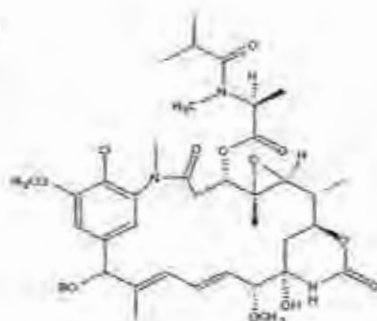
2.3.4 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica de la familia Rhamnaceae

Los constituyentes de la familia Rhamnaceae incluyen quinonas (antraquinonas, antranoles y sus glucósidos), alcaloides de tipo benzilisoquinolina y de tipo ciclo péptidos (en varios géneros), saponinas y triterpenoides (Evans, 2002; Heinrich *et al.*, 2004).

2.3.5 Conocimiento fitoquímico y actividad biológica del género *Colubrina*

En diferentes estudios del género *Colubrina* se ha reportado la presencia de actividad citotóxica significativa en extractos de *C. macrocarpa* y *C. texensis*, identificándose de esta última al acetato de colubrinol (Figura 2.7a) como el metabolito responsable de la actividad (Popoca *et al.*, 1998; Wani *et al.*, 1973). De extractos de *C. elliptica* se ha reportado el aislamiento e identificación de saponinas (Figura 2.7b) (Ouland-Ali *et al.*, 1994), en tanto que en *C. faralao* se han encontrado alcaloides aporfínicos, ácidos fenólicos y varios flavonoides cuyas agliconas fueron identificadas como mircetina, kaempferol y quercetina (Figura 2.7c; Guinaudeau *et al.*, 1981). De *C. granulosa* se han aislado cinco ácidos triterpenoides (Figura 2.7d) (Roltman & Jurd, 1978), mientras que en *C. retusa* se reporta la presencia de tres jujubogeninas con actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y *Mycobacterium intracellulare* (Figura 2.7e; Xing-Cong *et al.*, 1999; Elsohly *et al.*, 1999). Recientemente se identificó al crisofanol (Figura 2.7f) como uno de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Streptococcus aureus*, detectada en el extracto de raíces de *C. greggii* (García-Sosa *et al.*, 2006). El crisofanol es utilizado como purgante y posee actividad bacteriostática contra *S. epidermidis* y *Shigella sonnei* (Kambizi *et al.*, 2004), además de actividad antiinflamatoria, antitumoral (Zhang *et al.*, 2004) y antifúngica (Kuhnert & Molod, 2005).

a



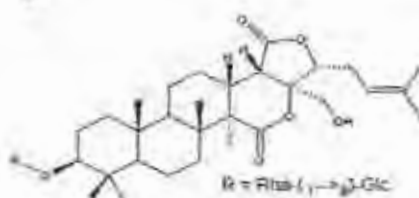
Colubrinol

$R = H$

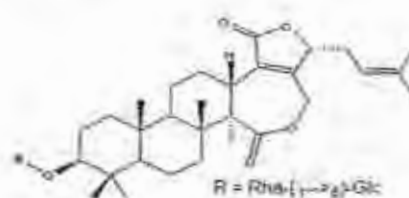
Acetato de colubrinol

$R = COCH_3$

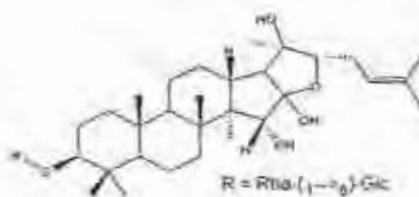
b



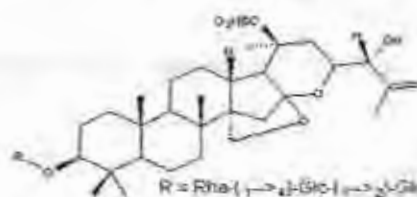
Mabiósido B



Mabiósido C



Mabiósido D



Mabiósido E

Figura 2.7. Ejemplos de metabolitos obtenidos del género *Colubrina*.

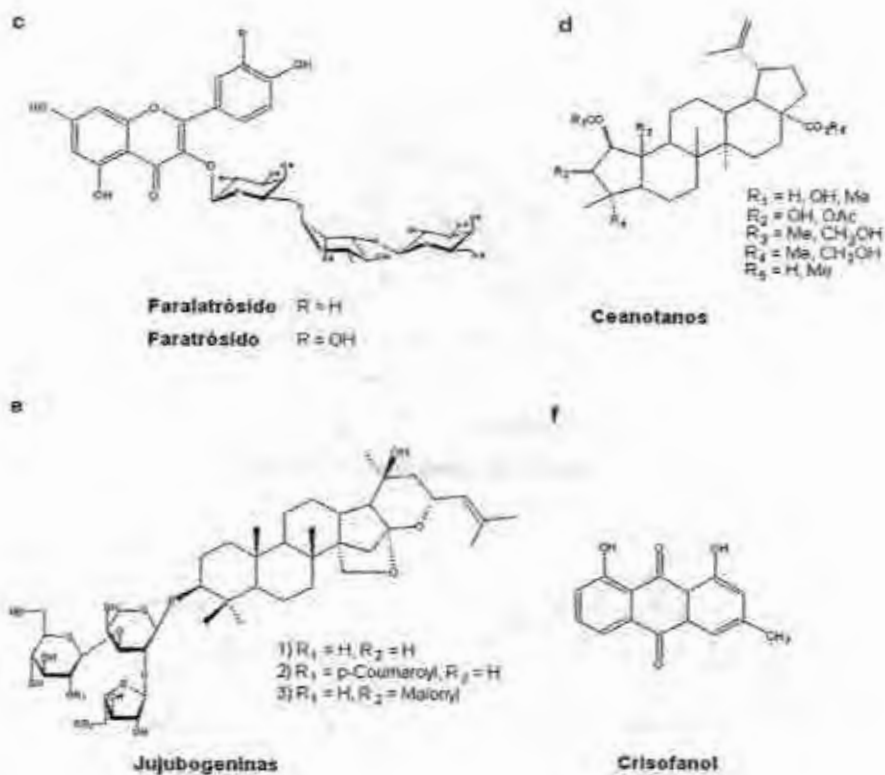


Figura 2.7. (cont.) Ejemplos de metabolitos obtenidos del género *Colubrina*.

2.4 REFERENCIAS

- Ankli A., Sticher, O. and M. Heintich (1999). *Medical ethnobotany of the yucatec maya: healers' consensus as a quantitative criterion*. *Economic botany*, 53, 144-160.
- Abdel-Kader, M., Wisse, J., Evans, R., Van der Werff, H. and D. Kingston (1997). *Bioactive iridoids and a new lignan from Allamanda cathartica and Himanthus fallax from the Suriname rainforest*. *J. Nat. Prod.*, 60, 1294-1297.
- Argüeta, A., Cano, L. y M. Rodarte (1994). *Atlas de la medicina tradicional mexicana*, Vol 2; Instituto Nacional Indigenista. México, pp. 204.
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Duran, R. and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andreuxii*. *J. Ethnopharmacol.*, 86, 243-247.
- Delorenzi, J.C., Attias, M., Gattas, C.R., Andrade C., R., Pinto, A.C., Henriques, A.T., Bou-Habib, D.C. and E.M.B. Saraiva (2001). *Antileishmanial activity of an indole alkaloid from Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1349-1354.
- Elsohly, H.N., Danner, S., Li, X.C., Nimrod, A.C. and A.M. Clark (1999). *New antimycobacterial saponin from Colubrina retusa*. *J. Nat. Prod.*, 62, 1341-1342.
- Endress, M.E. and P. Bruyns (2000). *A revised classification of the Apocynaceae s.l.* *Bot. Rev. (Lancaster)*, 66, 1-56.
- Evans, W.C. (2002). *Trease and Evans Farmacognosy*. W.B. Saunders & Co, London. ch 4, pp. 28-29.
- Fernández, R.N. (1986). *Flora de Veracruz*. INIREB, 1ra Ed., Xalapa, Veracruz, pp. 16-17.
- García-Sosa, K., Villarreal-Alvarez, N., Lübber, P. and L.M. Peña-Rodríguez (2006). *Chrysophanol an antimicrobial anthraquinone from the root extract of Colubrina greggii*. *J. Mex. Chem. Soc.*, 50, 76-78.

- Germplasm Resources Information Network (GRIN). *Genera of Apocynaceae tribe Echlteae* Retrieved June 20, 2010 from <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/gnlist.pl?1688>
- Guinaudeau, H., Seligmann, O., Wagner, H. and A. Neszmely (1981). *Faralatoside and faratroside, two flavonol triglycosides from Colubrina faralatra*. *Phytochemistry*, 20, 1113-1116.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. and E. M. Williamson (2008). *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy* Churchill Livingstone Elsevier. Hungary, pp. 44.
- Johnston, M.C. (1971). *Revision of Colubrina (Rhamnaceae)*. *Brittonia*, 23, 2-53.
- Kambizi, L, Sultana, N. and A.J. Afolayan (2004). *Bioactive compounds isolated from Aloe ferox: A plant traditionally used for the treatment of sexually transmitted infections in the eastern cape, South Africa*. *Pharm. Biol.*, 42, 636-639.
- Kariba, R.M., Houghton, P.J. and A. Yenesew (2002). *Antimicrobial activities of a new schizozygano indoline alkaloid from Schizozygia coffaeoides and the revised structure of isosquizogaline*. *J. Nat. Prod.*, 65, 566-569.
- Kuhnert, N. and Y.H. Molod (2005). *An efficient total synthesis of chrysophanol and the senoside C aglycon*. *Tetrahedron Lett.*, 46, 7571-7573.
- Marcano, D. and M. Hasegawa (2002). "Productos naturales. Una vision general" *En: Fitoquímica organica*. Unidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela. pp. 60.
- Morales, J.F. (2009). *Estudios en las Apocynaceae neotropicales XXXIX: Revisión de las Apocynoideae y Rauvolfioideae de Honduras*. *An. Jard. Bot. Madr.*, 66, 217-262.
- Qulad-Ali, A., Guillaume, D., Weniger, B., Jiang, Y. and R. Anton (1994). *Mabiosides C-E: triterpenoid saponins from the bark of Colubrina elliptica*. *Phytochemistry*, 36, 445-448.

- Piloto, I.C., Campana, M.V., Manchado, G., León, L., Filho, L.G., Bissoli, H.L. and A.J. Braz (2004). *Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from Aspidosperma ramiflorum*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99, 325-327.
- Popoca, J., Aguilar, A., Alonso, D. and M.L. Villarreal (1998). *Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in mexican tradicional medicine*. J. Ethnopharmacol., 59, 173-177.
- Pulido, M.T. and L. Serralta (1993). *Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el Estado de Quintana Roo, México*; Centro de Investigaciones de Quintana Roo, Chetumal, Quintana Roo, México, pp. 6.
- Roitmain, J.N. and L. Jurd (1978). *Triterpenoid and phenolic constituents of Colubrina granulosa*. Phytochemistry 17, 491-494.
- Tillequin, F., Michael, S. and I. Seguin (1993). "Pirrolizidine alkaloids" in *alkaloids and sulphur compounds*. Waterman P.G. ed., Academic press, San Diego, Vol. 8. pp. 175-181.
- Urbina, J.A., Payares, G., Contreras, L.M., Llendo, A., Sanoja, C., Molina, J., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P. and D. Loebenberg (1998). *Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: In vitro and in vivo studies*. Antimicrob. Agents Chemother., 42, 1771-1777.
- Wani, M.C., Taylor, H.L. and M.E. Wall (1973). *Plant antitumour agents: Colubrinol acetate and colubrinol, antileukaemic ansa macrolides from Colubrina texensis*. J.C.S. Chem. Comm., 390.
- Woodson, R.E. (1936). *Studies in Apocynaceae IV. The American genera of Echitoideae* Ann. Mo. Bot. Gard., 23, 198-205.
- Xing-Gang, L., ElSohly, H.N., Nimrod, A.C. and M.A. Clark (1999). *Antifungal jujubogenin saponins from Colubrina retusa*. J. Nat. Prod., 62, 674-677.
- Yam-Puc, J.A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M.P., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wendt, O.F., Sterner, O. and L.M. Peña-Rodríguez (2009). *Trinorsesquiterpenoids from the root extract of Pentelinon andrieuxii*. J. Nat. Prod., 72, 745-748.

Zhang, W., Jixun, M., Chen, Y. and D. Guo (2004). *Microbial glycosylation of four free anthraquinones by Absidia coerulea*. Biotechnol. Lett. 26, 127-131.

CAPÍTULO 3

Actividad leishmanicida de los extractos crudos y fracciones de partición de *Pentalinon andrieuxii* Müell. Arg. y *Colubrina greggii* S. Watson¹

3.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

Los estudios biodirigidos o semibiodirigidos emplean técnicas de bioensayo para detectar un cierto tipo de actividad biológica en un extracto crudo o en una fracción semipurificada, así como para guiar el proceso de purificación de los metabolitos responsables de la actividad biológica. En este capítulo se describe la obtención de los extractos orgánicos crudos de *P. andrieuxii* y *C. greggii* var *yucatanensis*, su fraccionamiento inicial, la obtención de cuatro metabolitos puros, así como la evaluación de su actividad leishmanicida (sección 3.2). Los resultados de la evaluación inicial de los extractos y fracciones semipurificadas de las dos especies contra promastigotes de *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, mostraron que las fracciones de baja polaridad de *P. andrieuxii* y de *C. greggii* poseen actividad leishmanicida. Dada la actividad de la fracción de polaridad baja **DCG-3A** y de discarina B (**NCG-5C**) contra promastigotes de *L. aethiopica* (LD_{50} de 7.2 y 62.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente), se procedió a su evaluación sobre amastigotes axénicos encontrándose que poseen una menor actividad (LD_{50} de 27.1 y 94.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente). Asimismo se observó que la fracción **DCG-3A**, a una concentración de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reduce significativamente (ca. 50%) la infección en macrófagos derivados de monocitos (THP-1) sin mostrar toxicidad en células humanas. Estos resultados confirman la presencia de metabolitos con actividad leishmanicida en la fracción de baja polaridad de *C. greggii*. Finalmente, se incluye una extensión de los materiales y métodos que detallan los rendimientos de los procesos de extracción, así como otros procedimientos generales no incluidos en la publicación (sección 3.3).

¹ Los resultados de la evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos crudos, fracciones semipurificadas y metabolitos puros de *P. andrieuxii* y *C. greggii* se incluyen en el trabajo "Leishmanicidal activity of Yucatecan medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneous leishmaniasis" publicado en J. Parasitol. (2009), 95 (2), 456-460.

3.2 LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF YUCATECAN MEDICINAL PLANTS ON *LEISHMANIA* SPECIES RESPONSIBLE FOR CUTANEOUS LEISHMANIASIS[§]

Giulia Getti*, Priyanka Durgadoss*, Dafne Domínguez-Carmona†, Zhelmy Martín-Quintan†, Sergio Peraza-Sánchez†, Luis Manuel Peña-Rodríguez†, and David Humber†

3.2.1 Abstract

The leishmanicidal activity of 15 extracts and 4 pure metabolites obtained from *Urechites andrieuxii*, *Colubrina greggii*, *Dorstenia contrajerva*, and *Tridax procumbens* was evaluated using the newly developed MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; inner salt) assay, optimized for promastigotes of *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, and *Leishmania aethiopica*, as well as for *L. aethiopica* axenic amastigotes. The assay was then used for calculating the percentage of viable stationary phase parasites after a 24-hr treatment with each plant extract or pure metabolite. The 3 most active samples, 2 from *C. greggii* (**DCG-5C** and **DCG-3A**) and 1 from *T. procumbens* (**TPZ-2A**), showed LD₅₀ values of 62.4, 7.2, and 18.5 µg/ml, respectively, on stationary promastigotes, and of 94.2, 27.1, and 95.2 µg/ml, on amastigotes of *L. aethiopica*. Moreover, **TPZ-2A** and **DCG-3A** significantly reduced the percentage of infected monocytederived macrophages (THP-1). The percentage of infected cells decreased from 69.9% ± 2.5% to 20.8% ± 2% when the cells were treated with the **DCG-3A** fraction and to 14.9% ± 0.5% when treated with **TPZ-2A**, without significantly decreasing the number of human cells. These findings indicate the presence of potentially bioactive metabolites in the roots of *C. greggii* and in *T. procumbens* and reflect the importance of pursuing the bioassay-guided purification of these metabolites.

[§] Esta sección ha sido publicada en *Journal of Parasitology*, (2009) 95, 456-460.

*School of Health and Bioscience, University of East London, London, E15 4LZ, U.K. e-mail: g.getti@uel.ac.uk

3.2.2 Introduction

Leishmaniasis is a group of tropical diseases caused by protozoan parasites. These parasites enter immune system cells following the bite of an infected sand fly and spread either to the skin, causing disfiguring lesions, or to internal organs, causing lethal infections (Pearson *et al.*, 1983). This disease affects over 20 million people around the world and is now endemic to 88 countries on 5 continents. About 350 million people are at risk of being infected, with 1.5–2 million children and adults developing the disease each year (Desjeux, 2004). The global prevalence of leishmaniasis has risen in recent times because of an increase in international travel, human alteration of both vector and host habitats, and concomitant factors that increase susceptibility, such as human immunodeficiency virus infection and malnutrition. Recent international conflicts have also contributed to an increase in and spread of leishmaniasis in previously unaffected countries (Rosypal *et al.*, 2003). In Mexico, clinical and epidemiological studies have demonstrated that the woodland regions of the Yucatan peninsula constitute an endemic area for this disease (Arguello, 1995; Vargas-González *et al.*, 1999; Andrade-Narváez *et al.*, 2005).

Although the causative agents of leishmaniasis have been known and studied since 1903 (Donovan, 1903; Leishman, 1903), to date, an effective cure for the disease does not exist. The chemotherapeutic agents most commonly used for treating leishmaniasis, i.e., sodium stibogluconate (Pentostam®), *N*-methylglucamine antimoniate (Glucantime®), pentamidine (Pentacarinat), and amphotericin B (Fungizone®, Ambisome®), are not effective when administered orally. Moreover, they often require long periods of treatment and cause serious side effects, including cardiac and renal toxicity (Murray, 2001; Akendengue *et al.*, 2002). This has prompted the World Health Organization (WHO) to emphasize the need for development of new drugs in the treatment of leishmaniasis (WHO, 2005). Another drug that recently became available for the treatment of leishmaniasis is miltefosine. The use of this drug was approved in India in 2002 and in Colombia in 2005; it is still under investigation for possible use in the rest of the world.

Recently, information regarding the use of plants in traditional medicine has been of considerable interest for the acquisition of new and better pharmaceuticals. It is estimated that close to 90% of all plant species have yet to be studied for their potential as anti-*Leishmania* spp. agents (Hamburger & Hostettmann, 1991; Kinghorn, 1992).

Mexico is recognized as having a particularly rich and unexploited biodiversity, which includes more than 20,000 plant species. Of these, 7,000 are commonly used in the practice of traditional medicine, with 800 of them recognized as medicinal plants in the Yucatan peninsula. However, despite the richness and variety of the peninsula's medicinal flora, less than 2% of the plant species classified as medicinal have been examined from a phytochemical or pharmacological perspective (Meckes *et al.*, 1993).

Recently, as part of a project directed toward evaluating the Yucatecan flora as a potential source of new anti-protozoan agents, a number of plants commonly used in Yucatecan traditional medicine for the treatment of parasitic diseases were examined for their leishmanicidal, trypanocidal, and anti-malarial effectiveness. Crude methanol extracts of *C. greggii* and *U. andrieuxii* showed activity against promastigotes of *L. donovani*, *L. braziliensis*, and *L. amazonensis* (Chan-Bacab *et al.*, 2003), and those of *T. procumbens* and *D. contrajerva* showed similar activity when tested against promastigotes of *L. mexicana* (Peraza-Sanchez *et al.*, 2007).

Here, we report on the evaluation of the leishmanicidal activity of a number of extracts, purified fractions, and secondary metabolites obtained from *U. andrieuxii*, *C. greggii*, *D. contrajerva*, and *T. procumbens* when tested against promastigotes of *L. aethiopica*, *L. tropica*, and *L. major*, and axenic amastigotes of *L. aethiopica*.

3.2.3 Materials and methods

3.2.3.1 Plant material

Whole plants of *T. procumbens* were collected in Mérida, Yucatan, México, between February and July 2004; a voucher specimen was authenticated by F. May-Pat and deposited at the herbarium of "Unidad de Recursos Naturales-CICY" under the code number FMay-1955.

Leaves of *U. andrieuxii* Muell.-Arg. were collected northeast of Campeche, México, at the 3.5-km mark on the road to Chiná, Campeche, México, in April 2006; a voucher specimen was deposited at the herbarium of "Unidad de Recursos Naturales-CICY" under collection number P. Simá 2245.

Roots of *C. greggii* S. Watson were collected in Abalá, Yucatan, México, in November 2000; a voucher specimen was deposited at the

herbarium of "Unidad de Recursos Naturales-CICY" under collection number P. Simá 2503.

3.2.3.2 Preparation of extracts and initial fractionation

Tridax procumbens: Dry-ground whole plants were macerated 4 times with methanol at room temperature. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded the crude methanolic extract **TPZ-1**. A portion of the extract was suspended in 75% aqueous methanol, and the resulting suspension was successively partitioned between hexane and dichloromethane to produce the corresponding low (**TPZ-2A**) and medium-low (**TPZ-2B**) polarity fractions.

Urechites andrieuxii: Dry-ground leaves were extracted through maceration (4 times, 72 hr each) with ethanol at room temperature. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded the crude ethanolic extract **DUA-1**, a portion of which was suspended in a 3:2 (v/v) mixture of water-methanol. The resulting suspension was successively partitioned between hexane, ethyl acetate, and water-saturated butanol to produce the corresponding low (**DUA-2A**), medium (**DUA-2B**), and high (**DUA-2C**) polarity fractions. A precipitate rich in betulinic acid, identified by comparing its spectroscopic data with those reported in the literature (Mahato & Kundu, 1994), obtained while concentrating fraction **DUA-2B**, was labelled **DUA-2B1**. Similarly, a water-saturated butanol extraction of an aqueous layer, also obtained while concentrating fraction **DUA-2B**, yielded fraction **DUA-2B2b**. Successive, preliminary, chromatographic purification of the low and medium polarity fractions yielded the pure metabolites, taraxasterol (**DUA-5I**) and **DUA-5F**, respectively. Taraxasterol was identified by both thin-layer and gas co-chromatography with an authentic sample and by comparing its MS fragmentation pattern with that reported in the literature (Can-Aké *et al.*, 2004).

Colubrina greggii: Dry-ground roots were macerated 4 times (72 hr each) with ethanol at room temperature. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded the crude ethanolic extract **DCG-1**. A portion of the crude extract was suspended in a 3:2 (v/v) mixture of water-methanol, and the resulting suspension was successively partitioned between hexane, ethylacetate, and water-saturated butanol, to produce the corresponding low (**DCG-3A**), medium (**DCG-3B**), and high (**DCG-3C**) polarity fractions. Successive preliminary chromatographic purification of the medium polarity fraction yielded the pure metabolites **NCG-2F1** and **NCG-5C**.

3.2.3.3 Leishmanicidal activity assay

Samples (extracts, fractions, and pure metabolites) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Gillingham, U.K.) and diluted with liquid medium to final concentrations ranging from 100 to 1.5 µg/ml, maintaining the final DMSO concentration at a maximum of 0.05% w/v. Parasites were distributed in 96-well plates (Nunc, Loughborough, U.K.) (1×10^6 parasites/ml) in triplicate, and each experiment was repeated 3 times. Plates were incubated for 24 hr at 22 °C or 26 °C, depending on the species being tested. Inhibition of promastigote growth was determined by the MTS assay (Ganguly *et al.*, 2006), after optimizing it for *L. aethiopica*, *L. tropica*, and *L. major*. The percentage of growth inhibition was determined by comparing the treated groups with untreated controls after 48 hr. Amphotericin B was used as a positive control.

3.2.3.3.1 MTS assay

A solution of MTS (Promega, Southampton, U.K.) was prepared (2 mg/ml in phosphate-buffered saline; 0.02 M PBS, pH 7.2) and stored at -20 °C. Phenazine methosulfate (PMS, Sigma-Aldrich) was similarly prepared (0.92 mg/ml in 0.02 M PBS, pH 7.2) and stored at -20 °C. Both solutions were stored in the dark and combined just prior to use. For the evaluation, 20 µl of an MTS/PMS (5:1) mixture was added to each well containing 200 µl of treated and/or untreated *Leishmania* spp. cultures and seeded at an initial concentration of 10^6 cells/ml; the entire plate was incubated at 37 °C for 3 hr. The absorbance was measured at 490 nm and the percentage of viability was calculated as described by Ganguly *et al.*, (2006).

3.2.3.3.2 Optimization of MTS assay

Selection of medium and optimum wavelength: All 3 species of *Leishmania* spp. were cultured in both DMEM-F12 medium and M199 (Sigma- Aldrich), supplemented with 10% FCS (Sigma-Aldrich). Following identification of DMEM-F12 as the best candidate to support the growth of *Leishmania* spp., 10^7 parasites/ml were plated and incubated with 20 µl of MTS/PMS at 37 °C. The absorbance spectrum of soluble formazan in DMEM-F12 medium between 375 and 690 nm was acquired in a Multiskan spectrum (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

Selection of optimum incubation temperature/time and MTS/PMS ratio: Since the assay is performed at 37 °C and the temperature for optimum growth of *L. aethiopica* is 22 °C, it was necessary to determine the

optimum incubation temperature; in this case, it was found to be 37 °C. Various MTS/PMS ratios (40:1, 20:1, 10:1, 5:1) and incubation times (1, 2, 3 hr) were evaluated; the 5:1 ratio and 3 hr incubation time were selected.

Establishment of linearity: Promastigotes of *L. aethiopica*, *L. tropica*, and *L. major*, and amastigotes of *L. aethiopica* were seeded at concentrations ranging from 4.6×10^6 to 1.8×10^4 cells/200 μ l in a 96-well plate, and absorbance was read at 495 nm following 3-hr incubation with a 5:1 MTS/PMS ratio.

3.2.3.4 *Leishmania* spp. parasites and cell lines

Promastigotes: Promastigote inhibition studies were performed on *L. aethiopica* (MHOM/ET/72/L100) and *L. tropica* (MHOM/SU/58/OD) grown at 22 °C and *L. major* (MHOM/SU/73/5ASKH) grown at 26 °C in DMEM-F12 medium, supplemented with 10% fetal calf serum and glutamine (Sigma-Aldrich).

Axenic amastigotes: These stages were obtained from promastigote cultures of *L. aethiopica* (MHOM/ET/72/L100). Cultures of promastigotes in the log phase were washed in PBS and adjusted to a concentration of 10^6 organisms/ml in 7 ml of fresh modified JH30 medium at pH 5 and incubated at 32 °C. Complete transformation into amastigotes was achieved within 10 days of incubation. The parasites were then maintained in JH30 medium at an adjusted pH of 5 for 5 mo. Amastigote inhibition studies were performed on parasites that had been axenically reverted back to the promastigote stage 6 times.

Human monocytes: THP-1 cells were maintained in the same medium used for the parasites, at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator. Cells were subcultured every second day at a starting concentration of 5×10^5 cells/ml. Cells in late log phase were incubated at a starting concentration of 10^6 cells/ml in 96-well plates. Samples were incorporated into triplicate cultures at a final DMSO concentration of 0.05%. After 24 hr of incubation at 37 °C, growth was estimated by counting viable cells with a hemacytometer, after staining with trypan blue.

Infected human monocytes: Infection was established after THP-1 cells were transformed into nonadherent macrophages by 3 days treatment with 1 μ M retinoic acid (Sigma). Transformed THP-1 (from the European Collection of Cell Cultures [ECACC], Porton Down, U.K.) cells were infected with stationary phase promastigotes of *L. aethiopica* at a ratio of 10:1 and maintained for 48 hr at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator. TPZ-2A

and DCG-3A were then added at a concentration of 5 µg/ml, and the treated cells were incubated for a further 24 hr before analysis. The activity was determined from the percentage of infected cells in treated and untreated cultures in methanol-fixed and Giemsa-stained preparations. The total number of cells was estimated by counting the number of THP-1 cells per field of view. Each data set came from the average of 3 experiments, each of which was done in triplicate. A minimum of 100 macrophages was counted for each slide.

3.2.3.5 Statistical analysis

The effects of the samples on cell viability were expressed as LD₅₀, which is the concentration required to kill 50% of the given population. LD₅₀ values were calculated from graphic extrapolation of dose-response curves and confirmed by probit analysis with logit transformation of dose response curve. The relative median potency was also estimated via this analysis, assuming a parallel relation between the samples' response curves. Since a goodness-of-fit chi-square test was significant, a heterogeneity factor was used in the calculations.

3.2.4 Results

The various plant extracts, semi-purified fractions, and purified metabolites are listed and described in Table 3.2.

Table 3.1. List of plant extracts, fractions, and pure metabolites from Yucatecan plants.

Code	Solubility	Description
DUA-1	EtOH, MeOH	Crude extract from leaves of <i>U. andrieuxii</i>
DUA-2A	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Low polarity fraction, from partition of DUA-1 with hexane
DUA-2B	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Medium polarity fraction, from partition of DUA-1 with ethylacetate
DUA-2B1	MeOH/CH ₂ Cl ₂	Precipitate rich in betulinic acid
DUA-2B2	MeOH/CH ₂ Cl ₂	High polarity fraction, from partition of aq. DUA-2B with butanol
DUA-2C	MeOH/CH ₂ Cl ₂	High polarity fraction, from partition of DUA-1 with butanol
DUA-5F	CHCl ₃ /MeOH	Pure unknown metabolite from <i>U. andrieuxii</i>
DUA-5I	CHCl ₃ /MeOH	Taraxasterol from <i>U. andrieuxii</i>
DCG-1	EtOH, MeOH	Crude extract from roots of <i>C. greggii</i>
DCG-3A	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Low polarity fraction, from partition of DCG-1 with hexane
DCG-3B	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Medium polarity fraction, from partition of DCG-1 with ethylacetate
DCG-3C	MeOH/CH ₂ Cl ₂	High polarity fraction, from partition of DCG-1 with butanol
NCG-2F1	MeOH	Pure metabolite from <i>C. Greggii</i>
NCG-5C	CHCl ₃	Pure metabolite from <i>C. Greggii</i>
TPZ-1	MeOH	Crude extract from <i>T. procumbens</i> , whole plant
TPZ-2A	Hexane	Low polarity fraction, from partition of TPZ-1 with hexane
TPZ-2B	CH ₂ Cl ₂	Low polarity fraction, from partition of TPZ-1 with dichloromethane
DCRZ-1	MeOH	Crude extract from roots of <i>D. contrajerva</i>
DCHZ-1	MeOH	Crude extract from leaves of <i>D. contrajerva</i>

The leishmanicidal activity of all samples was evaluated using the MTS assay (Ganguly *et al.*, 2006); since this assay had never before been used for *L. aethiopica*, it was optimized for this species following the procedure described above. All samples were initially tested for their leishmanicidal activity at 100 µg/ml, using *Leishmania* spp. promastigotes (Table 3.3). Of the species tested, *L. aethiopica* proved to be the most sensitive to the various samples, showing percentage values of viable cells as low as 1.75 after 24 hr of treatment, while *L. major* appeared to be the most resistant to the action of the plant extracts, except for DUA-1.

Table 3.2. Effect of 24-hr treatment with the plant extracts at a concentration of 100 µg/ml on *L. aethiopica*, *L. major*, and *L. tropica* metacyclic promastigotes. The extracts shown in bold were selected for further analysis.

Code	<i>L. tropica</i> % Viable Cell ± SD	<i>L. major</i> % Viable Cell ± SD	<i>L. aethiopica</i> % Viable Cell ± SD
DUA-1	24.57 ± 0.65	27.13 ± 2.28	41.37 ± 5.40
DUA-2 ^a	18.80 ± 1.30	51.82 ± 2.29	16.78 ± 1.58
DUA-2B	53.06 ± 1.96	73.69 ± 6.30	44.08 ± 3.91
DUA-2B1	44.76 ± 5.71	81.99 ± 0.86	42.95 ± 9.01
DUA-2B2	49.72 ± 9.95	56.88 ± 11.74	46.50 ± 19.74
DUA-2C	44.93 ± 0.25	92.71 ± 2.29	44.81 ± 13.97
DUA-5F	23.19 ± 0.98	63.56 ± 3.44	14.00 ± 1.99
DUA-5I	57.62 ± 0.57	104.86 ± 30.91	71.12 ± 7.27
DCG-1	46.83 ± 11.26	128.92 ± 11.74	40.40 ± 6.89
DCG-3A	14.03 ± 1.09	44.13 ± 1.72	7.36 ± 2.13
DCG-3B	29.86 ± 8.46	85.02 ± 3.44	28.09 ± 3.51
DCG-3C	55.37 ± 4.08	83.80 ± 16.60	30.51 ± 10.11
NCG-2F1	21.40 ± 1.22	90.08 ± 17.47	20.99 ± 1.48
NCG-5C	11.59 ± 1.39	85.02 ± 23.48	1.75 ± 1.14
TPZ-1	43.02 ± 1.30	78.14 ± 0.00	21.06 ± 3.29
TPZ-2 ^a	14.54 ± 0.49	25.30 ± 11.74	7.87 ± 3.19
TPZ-2B	31.55 ± 1.55	70.04 ± 2.29	21.30 ± 1.91
DCRZ-1	28.95 ± 1.80	74.70 ± 4.29	33.49 ± 7.32
DCHZ-1	35.30 ± 12.57	74.70 ± 4.86	33.90 ± 8.47

The 3 most active samples were further investigated for their effect on both promastigotes and axenic amastigotes of *L. aethiopica*. In this case, the most active sample, as indicated by the lowest LD₅₀ value (7.2 µg/ml in promastigotes and 27 µg/ml in amastigotes) and confirmed by the highest relative median potency (RMP) (29.24×10^{-4} in promastigotes and 7.78×10^{-4} in amastigotes), was the low-polarity fraction from *C. greggii* **DCG-3A** (Table 3.4). The second most active sample, also a low polarity fraction, **TPZ-2A** from *T. procumbens*, showed a very high LD₅₀ against *L. aethiopica* promastigotes, but not against its amastigotes.

Table 3.3. LD₅₀ and RMP values extrapolated from probit analysis with logit transformation of dose-response data. The RMP was estimated by using amphotericin B as a reference compound. Plant extracts were tested at concentrations ranging from 100 to 1.5 µg/ml.

Plant extract	LD ₅₀	RMP
TPZ-2A	18.5	11.43×10^{-4}
DCG-3A	7.2	29.24×10^{-4}
NCG-5C	62.4	3.38×10^{-4}
TPZ-2A in amastigotes	95.2	2.22×10^{-4}
DCG-3A in amastigotes	27.1	7.78×10^{-4}
NCG-5C in amastigotes	94.2	2.24×10^{-4}
Amphotericin B	0.02	1

Both fractions were tested for their ability to decrease infection in cells treated with 5 µg/ml of each semi-purified fraction; the results showed that both fractions significantly reduced ($P < 0.05$) the percentage of infected cells with respect to the percentage of untreated infected cells, going from $69.9\% \pm 2.5\%$ in the latter to $20.8\% \pm 2\%$ in infected cells treated with the **DCG-3A** fraction and to $14.9\% \pm 0.5\%$ in **TPZ-2A**-treated cells (Figure 3.1a). Neither treatment significantly affected the number of total cells counted in each slide (Figure 3.1b), suggesting that both fractions represent an important source of candidates for leishmaniasis therapy. Presently, the bioassay-guided purification of the extracts of both plants is in progress.

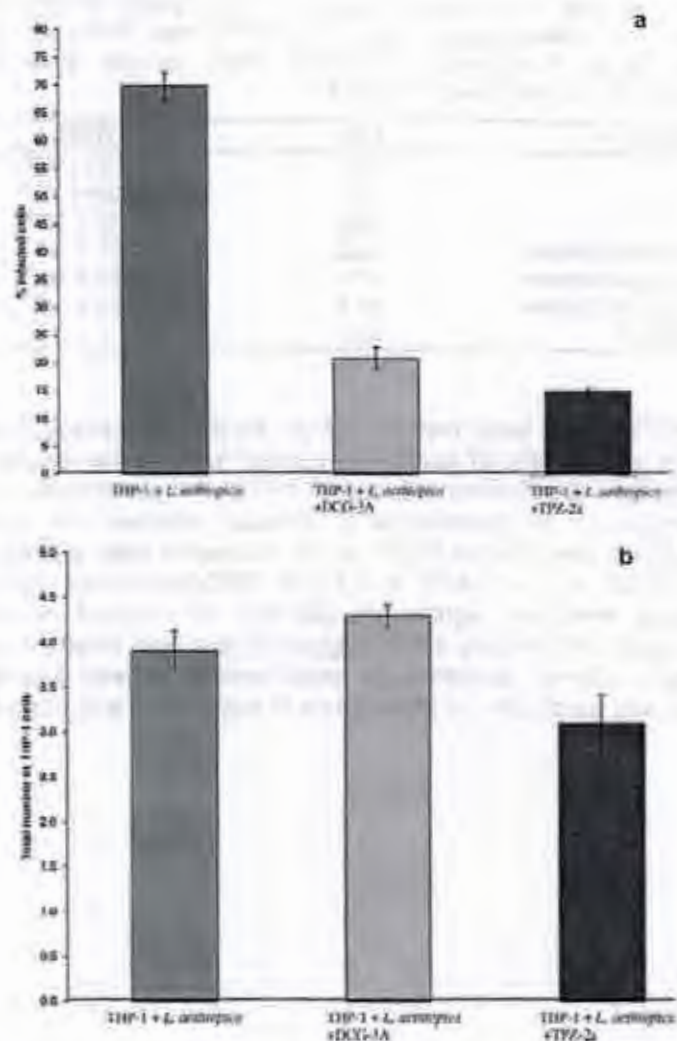


Figure 3.1. The effect of DCG-3A and TPZ-2A (5 μ g/ml) on terminally differentiated THP-1 cells infected with *L. aesthiopica* is reported, (a) The percentage of infected THP-1 cells following 24 hr treatment with the plant extracts is compared with the percentage of infected untreated THP-1 cells, (b) The effect of the same treatment on the number of total cells present in the slide. *L. aesthiopica* and THP-1 cells are present in all samples.

3.2.5 Discussion

The present study showed that both the root extract of *C. greggii* and the whole plant extract from *T. procumbens* were the most active against promastigotes of *L. aethiopica*, *L. tropica*, and *L. major*. Additionally, the results showed that for both plants, the metabolites responsible for the leishmanicidal activity are of low polarity, since fractionating of the corresponding crude extracts concentrated the activity against promastigotes of the 3 *Leishmania* spp. and on axenic amastigotes of *L. aethiopica* in the hexane fractions.

Both low-polarity fractions were also able to significantly reduce the percentage of infection in a population of pre-infected THP-1 cells, without significantly affecting the number of mammalian cells.

On the basis of the results obtained, and although it is not possible to establish the mechanism of action of either fraction at this stage, when considering the activity of the 2 semi-purified fractions against both promastigotes and amastigotes of *L. aethiopica*, it appears that the low-polarity fraction from *T. procumbens* (TPZ-2A) acts directly on the parasites by killing intracellular amastigotes.

Finally, the results showed that both *C. greggii* and *T. procumbens* can be considered as important natural sources of therapeutically active agents against leishmaniasis.

3.2.6 Acknowledgments

We are grateful to Kevin Clough, Ray Stocker, Mani Tripathi, Paulino Simá-Polanco, and Fabiola Escalante-Erosa for technical support.

3.2.7 Literature cited

- Akendengue, B., Roblot, F., Loiseau, P.M., Bories, C., Ngou-Milama, E., Laurens, A., and R. Hocquemiller (2002). *Klavanolide, an antiprotozoal lactone from Uvaria klaineana*. *Phytochemistry*, 59, 885-888.
- Andrade-Narváez, F.J., Medina-Peralta, S., Vargas-González, A., Canto-Lara, S.B., and S. Estrada-Parra (2005). *Histopathology of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania mexicana in the Yucatan Peninsula*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 47, 191-194.
- Argüello, C. (1995). *Leishmaniasis en Mexico*. *Avance y Perspectiva*, 14, 21.
- Can-Aké, R., Erosa-Rejón, G., May-Pat, N.F., Peña-Rodríguez, L.M. and S.R. Peraza-Sánchez (2004). *Bioactive terpenoids from roots and leaves of Jatropha gaudieri*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48, 11-14.
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., García, R.D. and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andrieuxii*. *J. Ethnopharmacol.*, 86, 243-247.
- Desjeux, P. (2004). *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27, 305-318.
- Donovan, C. (1903). *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India*. *British Medical Journal*, 2, 79.
- Ganguly, S., Bandyopadhyay, S., Sarkar, A. and M. Chatterjee (2006). *Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents*. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 79-86.
- Hamburger, M. and K. Hostettmann (1991). *Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine*. *Phytochemistry*, 30, 3864-3874.

- Kinghorn, A.D. (1992). "Plants as sources of medicinally and pharmaceutically important compounds" in *Phytochemical resources for medicine and agriculture*, H. N. Nigg, and D. Seigler (eds.). Plenum Press, New York, New York. pp. 75-95.
- Leishman, W.B. (1903). *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India*. British Medical Journal, 1: 1252-1254.
- Mahato, S.B. and A. Kundu (1994). ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids. A compilation of some salient features. *Phytochemistry*, 37, 1517-1575.
- Meckes, M., Mata, R. y X. Lozoya (1993). "La Investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana". En: *La Investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana en investigación farmacológica de plantas medicinales*. Secretaria de Salud Mexico, Mexico City, D.F.
- Murray, H.W. (2001). *Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2185-2197.
- Pearson, R.D., Wheeler, D.A., Harrison, L.H. and H. D. Kay (1983). *The immunobiology of leishmaniasis*. *Review of Infectious Diseases*, 5, 907-927.
- Peraza-Sanchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A.F., May-Pat, A., Sima-Polanco, P., Dumontell, E.M., Garcia-Miss, R. and M. Mutmartin (2007). *Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula*. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Durican, R.B., Waki, K., Chang, K.P. and D.S. Lindsay (2003). *Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: Isolation and immunohistochemical detection of Leishmania infantum from foxhounds from Virginia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, 691-693.
- Vargas-González, A., Canto-Lara, S.B., Damian-Centero, A.G. and F.J. Andrade-Narvaez (1999). *Response of cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) to treatment with meglumine antimoniate in Southeast Mexico*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 960-963.

3.3 INFORMACIÓN ADICIONAL

3.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1.1 Procedimientos generales

Para los diferentes procesos de extracción y purificación se utilizaron disolventes grado técnico destilados en el laboratorio y disolventes grado analítico (Fermont). La evaporación de los disolventes se llevó a cabo a presión reducida, en un evaporador rotatorio (Büchi RE111) equipado con un baño de agua a 35° C. El análisis de los extractos, las fracciones y los metabolitos aislados se llevó a cabo por cromatografía en capa delgada (ccd), empleando cromatofolios de aluminio impregnados con gel de sílice (25 DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck) e indicador fluorescente. Los cromatogramas se observaron primero bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) y posteriormente se sumergieron en una disolución de ácido fosfomolibdico al 5%, se secaron y se calentaron con una pistola de aire caliente durante 1 ó 2 minutos hasta visualizar los componentes. En las purificaciones por cromatografía en columna de gravedad y para adsorber las muestras purificadas por cromatografía líquida al vacío, se utilizó gel de sílice de 70-230 mallas (E.M. Merck). Las columnas para las purificaciones por cromatografía líquida al vacío se empacaron con gel de sílice 60GF₂₅₄ grado ccd (E.M. Merck) y para las purificaciones por cromatografía en columna rápida tipo flash se usó gel de sílice de 200 a 400 mallas (Aldrich).

Los análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas se realizaron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies modelo 6890 N), acoplado a un detector másico (Agilent Technologies modelo 5975B). Las muestras se inyectaron al 1% en CHCl₃ grado analítico (Aldrich) y las separaciones se realizaron en una columna no polar HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. × 30µm). Se empleó He como gas acarreador y un programa de temperatura T₀ 150 °C (2 min), T_i 280 °C (35 min) con un gradiente 10° C/min. La temperatura del inyector y del detector másico se mantuvo a 280° C. Para los análisis de espectrometría de masas se utilizaron los equipos JEOL-JMS-SX102 y ESI-HRMS (electro-spray ionisation mass con el microsistema Waters Q-TOF).

3.3.1.2 Obtención del extracto crudo orgánico y fraccionamiento inicial del extracto orgánico crudo

Los rendimientos de las extracciones y particiones se resumen en el cuadro 3.4; la purificación e identificación de los metabolitos ácido betulínico (DUA-5F), discarina B (NCG-5C) y crisofaneína (NCG-2F1) se describen en los capítulos 4 y 5.

Cuadro 3.4. Rendimientos de los extractos orgánicos crudos y las fracciones de partición líquido-líquido de las especies en estudio.

Descripción	<i>P. andrieuxii</i>		<i>C. greggii</i>	
	Clave	Rendimiento (%)	Clave	Rendimiento (%)
Extracto orgánico crudo	DUA-1 ^a	54.53 g (14.9%)	DCG-1 ^a	219.5 g (11.6%)
Fracción de polaridad baja	DUA-2A ^c	2.15 g (21.5%)	DCG-3A ^c	0.4 g (4.5%)
Fracción de polaridad media	DUA-2B ^c	0.73 g (7.3%)	DCG-3B ^c	7.5 g (73.9%)
Precipitado	DUA-2B2b ^c	0.6 g (5.8%)	—	—
Fracción de polaridad alta	DUA-2C ^c	2.8 g (28.0%)	DCG-3C ^c	0.5 g (5.3%)

^a Rendimiento (w/w) obtenido con base a 365.1 g de material vegetal seco; ^b Rendimiento (w/w) obtenido con base a 1,890.5 g de material vegetal seco; ^c Rendimiento (w/w) obtenido con base a 10 g de extracto orgánico crudo.

CAPÍTULO 4

Actividad antiprotozoaria del ácido betulínico y sus derivados.²

4.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

La actividad biológica y los mecanismos de acción son características que se encuentran íntimamente ligadas a la estructura química. Los derivados de productos naturales de uso farmacológico, generados por modificaciones semisintéticas sin la alteración del grupo farmacóforo, tienen como objetivo la obtención de productos más efectivos contra los organismos blanco, con menores efectos secundarios o con mejores propiedades de absorción y distribución en el organismo.

En este capítulo se describe la actividad leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica del ácido betulínico y varios de sus derivados semisintéticos, así como un apartado que muestra los datos espectroscópicos más relevantes de estos productos (Sección 4.3). La evaluación de la actividad antiprotozoaria del ácido betulínico (**1**), mostró que este metabolito no posee actividad leishmanicida, pero presenta una moderada actividad tripanocida y una buena actividad antiplasmódica. Dada la potencial actividad tripanocida y antiplasmódica del ácido betulínico (**1**), una serie de derivados simples fueron preparados y evaluados. La evaluación de los derivados acetilado (**2**), oxidado (**3**) y metilado (**4**) del ácido betulínico, además de la betulina (**5**), mostró que mientras las modificaciones en la posición C-3 de la estructura de **1** aumentan la actividad leishmanicida (e.g. **2** y **3**), las modificaciones en las posiciones C-3 o C-28 (e.g. **2**, **3**, **4** y **5**), disminuyen la actividad tripanocida.

² Los resultados de este trabajo se incluyeron en el manuscrito "Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives", publicado en *Phytomedicine*, (2010), 17, 379-382.

4.2 ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF BETULINIC ACID DERIVATIVES[‡]

D. B. Domínguez-Carmona,^a F. Escalante-Erosa,^a K. García-Sosa,[‡] G. Ruiz-Pinell,^b D. Gutiérrez-Yapu,^b M. Chan-Bacab,^c A. Giménez-Turba,^b and L. M. Peña-Rodríguez^{a*}

^aUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, No. 130, Col. Chuburná, Mérida, Yucatán, 97200 México.

^bInstituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés (IIFB-UMSA), Miraflores, La Paz, Bolivia.

^cDepartamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, Campeche, México.

4.2.1 Abstract

Betulinic acid (**1**), isolated from the crude extract of the leaves of *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae), together with betulinic acid acetate (**2**), betulonic acid (**3**), betulinic acid methyl ester (**4**), and betulin (**5**) were evaluated for their antiprotozoal activity. The results showed that modifying the C-3 position increases leishmanicidal activity while modification of the C-3 and C-28 positions decreases trypanocidal activity.

Key words: *Pentalinon andrieuxii*; betulinic acid; leishmanicidal; trypanocidal; antiplasmodial.

[‡] Esta sección ha sido publicada en *Phytomedicine*, (2010) 17, 379-382.

* corresponding author: Tel. +52-999-9428330 ext 159; Fax: +52-999-9813900; e-mail: Imanuel@cicy.mx

4.2.2 Introduction

Protozoal diseases continue to be considered an important group of illnesses because of their significant number of cases and mortalities every year (WHO 2004). The chemotherapy against diseases such as leishmaniasis and trypanosomiasis is limited by the existence of only a few drugs in the market, most of which are of low efficacy, require a long and supervised treatment, show toxic side effects, and frequently lead to the appearance of resistant strains (Kayser *et al.*, 2002; Croft *et al.*, 2006; Ashutosh *et al.*, 2007); this reflects the need to continue searching for new and better antiprotozoals. Triterpenes are a group of natural products that have shown a wide range of biological activities, including leishmanicidal, trypanocidal and antiplasmodial (Chan-Bacab *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2003; Tolstikova *et al.*, 2006).

Recently, the chemical transformation of natural triterpenoids has been used to prepare derivatives with improved biological activity (Tolstikov *et al.*, 1997; Baltina *et al.*, 2003). Betulinic acid (**1**) is a lupane-type triterpene found in many plant species, which has been reported to exhibit anti-HIV-1, antibacterial, antifungal, antiplasmodial, and anti-inflammatory activities (Yogeeswari *et al.*, 2005).

Betulinic acid (**1**) has also been reported to inhibit growth of cancer cells, without affecting normal cells (Einzhammer & Xu 2004), and its lack of cytotoxic activity has been demonstrated in human astrocytes (Wick *et al.*, 1999), human dermal fibroblasts, peripheral blood lymphoblasts (Einzhammer & Xu 2004; Zuco *et al.*, 2002), and animal studies (Zuco *et al.*, 2002; Pisha *et al.*, 1995). Additionally, a number of betulinic acid derivatives have been prepared to enhance anti-HIV activity (Kashiwada *et al.*, 1996; Baglin *et al.*, 2003), to reduce the organotoxic effect of antitumor drugs, and to be evaluated as new anticancer agents (Rajendran *et al.*, 2008). However, and although **1** has been shown to suppress the activity of DNA topoisomerase I (Chowdhury *et al.*, 2002), and metabolites able to interact with human DNA are reported to be antiparasitic (Nenortas *et al.*, 1998; Rowe *et al.*, 2001; Baraldi *et al.*, 2004), little is known about the antiprotozoal activity of this triterpene. We wish to report here on the leishmanicidal, trypanocidal and antiplasmodial activities of betulinic acid (**1**) and a number of its derivatives (**2-5**).

4.2.3 Materials and Methods

4.2.3.1 Plant material

Leaves of *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg. (Apocynaceae) were collected 3.5 km northwest of Campeche, México, on the road to Chiná. A voucher specimen (P. Simá 2503) has been deposited in the Herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán.

4.2.3.2 Isolation of betulinic acid (1)

Dry, ground leaves of *P. andrieuxii* (365g) were extracted three times with ethanol (4 L) at room temperature. Evaporation of the solvent yielded the corresponding crude extract (54.5g, 14.9%), which was fractionated by successive liquid-liquid partition with hexane, ethyl acetate and butanol, to produce the corresponding low, medium and high polarity fractions. Purification of the low polarity fraction using silica gel (70-230 mesh, E.M. Merck) column chromatography and a gradient elution [$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99:1-90:10) mixtures] produced 62.7 mg (0.11%) of pure betulinic acid (1), identified by comparing its spectroscopic data with those reported in the literature (Mahato & Kundu, 1994; Macías *et al.*, 1994).

4.2.3.3 Preparation of betulinic acid derivatives

The structures of all derivatives were established by comparing their corresponding spectroscopic data with those reported in the literature (Macías *et al.*, 1994). Betulin (5), amphotericin B and chloroquine were purchased from Sigma.

4.2.3.3.1 Betulinic acid acetate (2)

A mixture of betulinic acid (10 mg), acetic anhydride (1 mL) and pyridine (0.5 mL) was allowed to stir at room temperature for 72 h. The reaction mixture was poured over distilled water (20 mL) and the resulting suspension was extracted twice with ethylacetate (2:1 v/v). The organic layer was washed successively with equal volumes of HCl (5%), NaOH (3%), H_2O , and NaCl satd., and then dried over anhydrous Mg_2SO_4 . Filtration and evaporation of the solvent yielded 10.5 mg (96.2%) of crude acetylated product, identified as betulinic acid acetate (2).

4.2.3.3.2 Betulonic acid (3)

A solution of 23.5 mg of betulinic acid in dichloromethane (2 mL) was treated with an excess of Corey's reagent (PCC) (Corey *et al.*, 1975). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 24 h and then filtered through a plug of silica gel (70-230 mesh), eluting with 50 mL of a 99:1 mixture of dichloromethane-methanol to produce 16.1 mg (68.6%) of crude oxidized product identified as betulonic acid (3).

4.2.3.3.3 Betulinic acid methyl ester (4)

A mixture of betulinic acid (13.5 mg), K_2CO_3 (200 mg), CH_3I (1 mL) and acetone (1 mL) was stirred for 72 h at room temperature. The reaction mixture was poured over distiller water (13 mL) and the resulting suspension was extracted twice with EtOAc (4:1, v/v); the organic phase was dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered and the solvent evaporated to produce 12 mg (86.2%) of crude esterified product identified as betulinic acid methyl ester (4).

4.2.3.4 Leishmanicidal assay

This assay was carried out following the procedure reported by Muñoz *et al.* (1994) and Inchausti *et al.* (1997). Briefly, strains of *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) and *L. donovani* (MHOM/74/PP75) were maintained in Schneider culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS); parasites in the log phase of their growth cycle were transferred to a microplate (96 wells; 1×10^6 parasites/well). Stock solutions of DMSO (blank), amphotericin B (positive control), betulinic acid, and the various betulinic acid derivatives were diluted in Schneider medium at $<100 \mu\text{g/mL}$, added to the plate, and incubated at 27°C for 72 h. The IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) values were obtained using a GraphPad Software Inc. ver. 4.00. All the assays were carried out in triplicate.

4.2.3.5 Trypanocidal assay

Trypanosoma cruzi strain Tulahuen parasites were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 5% FBS, following the procedure modified by Chataing *et al.* (1998). Briefly, parasites in the log phase of their growth cycle were transferred to a microplate (96 wells; 1×10^6 parasites/well). Stock solutions of benznidazole, DMSO (positive control and blank respectively), betulinic acid, and the various betulinic acid derivatives were diluted in LIT medium and added to a plate (100 μL) at

concentrations <100 µg/mL, and incubated at 27 °C for 72 h. The IC₅₀ (µg/mL) value was obtained using a GraphPad Software Inc. ver. 4.00.

4.2.3.6 Antiplasmodial assay

Plasmodium falciparum strain F32 was cultivated at 37 °C in RPMI medium with 10% of human serum and 4% of hematocrite (O, Rh+), under anaerobic conditions, according to the method of Trager & Jensen (1976). Cultures with 1% parasitemic and 2% hematocrite (100 µL) were transferred to a 96 wells plate. Stock solutions of chloroquine (control), betulinic acid, and the various betulinic acid derivatives were diluted in RPMI medium to a concentration of <10µg/mL and added to each well. The plate was then incubated at 37 °C for 48 h. The IC₅₀ values were calculated using the program a GraphPad Software Inc. ver. 4.00.

4.2.4 Results and Discussion

Betulinic acid (**1**) was obtained from the purification of the low polarity fraction of the leaf extract of *P. andrieuxii*, a plant whose extracts have been shown to possess leishmanicidal activity (Chan-Bacab *et al.*, 2003). Although the low polarity fraction had shown moderate leishmanicidal activity, the lack of activity of pure betulinic acid (**1**) indicated that the triterpene was not responsible for the weak leishmanicidal activity originally detected. However, testing of the pure metabolite against *T. cruzi* and *P. falciparum* showed that **1** has a moderate trypanocidal activity and a good antiplasmodial activity (Table 3.1). In order to explore the possibility of improving the antiprotozoal activity of **1**, a number of simple semisynthetic derivatives were prepared and/or evaluated; these derivatives included betulinic acid acetate (**2**), betuionic acid (**3**), betulinic acid methyl ester (**4**) and betullin (**5**) (Figure 3.1).

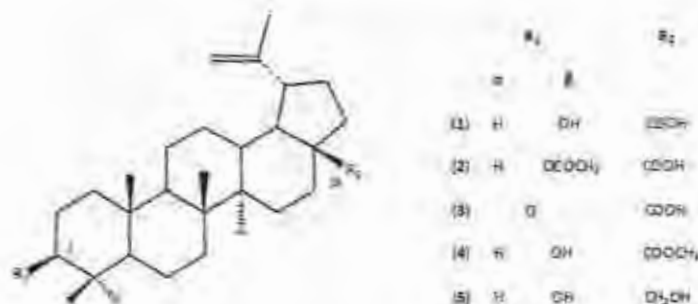


Figure 4.1. Structures of Betulinic acid (1), Betulinic acid derivatives (2-4) and betulin (5).

The results showed that modification of the C-3 hydroxyl group, either by esterification (to produce 2) or oxidation (to produce 3), resulted in a significant increase of leishmanicidal activity against *L. amazonensis* (Table 3.1). Alternatively, the modifications on the C-28 carboxyl group did not show a clear effect since while betulinic acid (1) and betulin (5) lack leishmanicidal activity, betulinic acid methyl ester (4) showed an improved activity against *L. braziliensis* (Table 3.1). On the other hand, the evaluation of the trypanocidal activity of the various terpenoids showed that any modification on the betulinic acid skeleton resulted in a lower activity (Table 3.1). Finally, and although our results showing betulinic acid (1) as an adequate antiplasmodial agent are in agreement with those reported in the literature (Ziegler *et al.*, 2004; Duker-Eshun *et al.*, 2004), testing of the various derivatives showed that only the esterification of the C-3 hydroxyl group (to produce 2) results in an improved activity (Table 3.1).

Table 4.1. IC₅₀ (μM) values of antiprotozoal activity of betulinic acid and derivatives

Sample	Leishmanicidal		Try- panocidal	Anti- plasmodial
	LA	M2903	TULA	F32
Betulinic acid (1)	>200	>200	50.0	22.5
Betulinic acid acetate (2)	44.9	>200	154.4	11.8
Betulonic acid (3)	51.2	>200	161.4	>20
Betulinic acid methyl ester (4)	>200	69.9	93.3	>20
Betulin (5)	>200	>200	173.0	>20
Amphotericin B	0.6	0.2	0.2	
Benznidazol			384.4	
Chloroquine				0.2

LA: *Leishmania amazonensis*; M2903: *L. braziliensis*; TULA: *Trypanosoma cruzi* tulahuén; F32: *Plasmodium falciparum*

The increase in leishmanicidal activity shown by **2**, **3**, and **4** suggests that preparation of other acyl derivatives at the C-28 position, maintaining a ketone or an ester group in C-3, can produce new derivatives with improved leishmanicidal and antiplasmodial activities, since an ester at the C-3 β position and a free carboxylic acid, a high hydrophilic group, or a hydrogen donating group at C-28 are required for cytotoxic and anti-HIV activities (Baglin *et al.*, 2003). Interestingly enough, betulinaldehyde has been reported to be active against amastigotes of *L. amazonensis* (Sauvain *et al.*, 1996), while the C-28 aldehyde derivative of betulonic acid has been shown to have a higher antitumoral activity than that of the parent metabolite (Kim *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2003; Dzuba *et al.*, 2006). Furthermore, betulonic acid (**3**) has been reported to be able to reduce the organotoxic effect of antitumor drugs (Sorokina *et al.*, 2004), while its C-28 amine derivatives are reported as potent inhibitors of tumor cell growth (Shintyapina *et al.*, 2007).

To date, there exist a number of reports in the literature describing the chemical modifications of betulinic acid to produce semisynthetic derivatives with enhanced anti-HIV and cytotoxic activities (Baglin *et al.*, 2003); however, little is known about the importance of the various functional groups in the betulinic acid skeleton, for the expression of antiprotozoal activity. This is the first report of the evaluation of the antiprotozoal activity of betulinic acid and a number of its derivatives and the first report of the betulinic acid derivative **2** with improved antiplasmodial activity.

4.2.5 Acknowledgements

The authors wish to thank to Paulino Simá for the identification of the plant material. This work was supported by Program CYTED (Projects X.5 and RIBIOFAR) and Project FOMIX-Yucatán (66262).

4.2.6 References

- Ashutosh, Sundar, S. and N. Goyal (2007). *Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania*. J. Med. Microb. 56, 143-153.
- Baglin, I., Miltaine-Offet, A.-C., Nour, M., Tan, K., Cavé, C. and M.-A. Lacaille-Dubois (2003). *A review of natural and modified betulinic acid, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents*. Mini Rev. Med. Chem. 3, 525-539.
- Baltina, L.A., (2003). *Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine*. Current Med. Chem., 10, 155-171.
- Baraldi, P.G., Bovero, A., Fruttarolo, F., Preti, D., Tabrizi, M.A., Pavani, M.G. and R. Romagnoli (2004). *DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents*. Med. Res. Rev. 24, 475-528.
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Duran, R. and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andreuxii*. J. Ethnopharmacol. 86, 243-247.
- Chan-Bacab, M.J. and L.M. Peña-Rodríguez (2001). *Plant natural products with antileishmanicidal activity*. Nat. Prod. Rep. 18, 674-688.
- Chataing, B., Concepción, J.L., Lobaton, R. and A. Usubillaga (1998). *Inhibition of Trypanosoma cruzi growth in vitro by Solanum alkaloids: a comparison with ketoconazole*. Planta Med. 64, 31-33.
- Chowdhury, A., Mandal, S., Mitra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S. and H.K. Majumder (2002). *Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives*. Med. Sciences Monitor 8, BR254-BR260.
- Corey, E.J. and W.J. Suggs (1975). *Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds*. Tetrahedron Lett. 31, 2647-2650.
- Croft, S.L., Sundar, S. and A.H. Fairlamb (2006). *Drug resistance in Leishmaniasis*. Clin. Microbiol. Rev. 19, 111-126.

- Duker-Eshun, G., Jaroszewski, J.W. and W.A. Asomaning (2004). *Antiplasmodial constituents of Cajanus cajan*. *Phytotherapy Res.* 18, 128-133.
- Dzubak, P., Hajdich, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M. and J. Sarek (2006). *Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications*. *Nat. Prod. Rep.* 23, 394-411.
- Einzhammer, D.A. and Z.Q. Xu (2004). *Betulinic acid: a promising anticancer candidate*. *IDrugs* 4, 359-373.
- Kashiwada, Y., Hashimoto, F., Cosentina, L.M., Chen, C.H., Garren, P.E. and K.H. Lee (1996). *Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents*. *J. Med. Chem.* 39, 1016-1017.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and S.L. Croft (2002). "Natural Products as potential antiparasitic drugs" in *Studies in Natural Product Research*, Atta-Ur-Rahman, pp. 779-848.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and S.L. Croft (2003). *Natural products as antiparasitic drugs*. *Parasitol. Res.* 90, S55-S62.
- Fujioka, T., Kashiwada, Y. and R.E. Kilkuskie (1994). *Anti-AIDS agents, betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from Syzygium claviflorum, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids*. *J. Nat. Prod.* 57, 243-247.
- Hata, K., Hori, K., Ogasawara, H. and S. Takahashi (2003). *Anti-leukemia activities of Lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene*. *Toxicology Lett.* 143, 1-7.
- Inchausti, A., Yaluff, G., Rojas de Arias, A., Torres, S., Ferreira, M. E., Nakayama, H., Schinini, A., Lorenzen, K., Anke, T. and A. Fournet (1997). *Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Besidiomycetes*. *Phytotherapy Res.* 11: 193-197.
- Jeong, H.J., Chai, H.B., Park, S.Y. and D.S.H.L. Kim (1999). *Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma*. *Biorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1201-1204.

- Kim, D.S.H.L., Pezzuto, J.M. and E. Pisha (1998). *Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma*. Biorg. Med. Chem. Lett. 8, 1707-1712.
- Macías, F.A., Simonet, A.M. and D.M. Esteban (1994). *Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of Melilotus messanensis*. Phytochemistry 36, 1369-1379.
- Mahato, S.B. and A.P. Kundu (1994). *¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features*. Phytochemistry 37, 1517-1575.
- Muñoz, V., Moretti, C., Sauvain, M., Caron, C., Porzel, A., Massiot, G., Richard, B. and L. Le Men-Olivier (1994). *Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from Peschiera van heurkii (Syn. Tabernamontana van heurkii)*. Planta Med. 60, 455-459.
- Nenortas, E.C., Bodley, A.L. and T.A. Shapiro (1998). *DNA topoisomerases: a new twist for antiparasitic chemotherapy?*. Biochem. Biophys. Acta. 1400, 349-354.
- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.S., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Beecher, C.W., Fong, H.H., Kinghorn, A.D. and D.M. Brown (1995). *Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis*. Nat. Med. 1, 1046-1051.
- Rajendran, P., Jaggi, M., Singh, M.K., Mukherjee, R. and A.C. Burman (2008). *Pharmacological evaluation of C-3 modified betulinic acid derivatives with potent anticancer activity*. Invest. New Drugs 26, 25-34.
- Rowe, T.C., Weissig, V. and J.W. Lawrence (2001). *Mitochondrial DNA metabolism targeting drugs*. Adv. Drug Deliv. Rev. 49, 175-187.
- Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J., Gayral, P. and J.P. Dedet (1996). *Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana Doliocarpus dentatus (Dellineaceae)*. Phytotherapy Res. 10, 1-4.

- Shintyapina, A.B., Shults, E.E., Petrenko, N.I., Uzenkova, N.V., Tolstikov, G.A., Pronkina, N.V., Kozhevnikov, V.S. and A.G. Pokrovsky (2007). *Effect of nitrogen-containing derivatives of the plant triterpenes betulin and glycyrrhetic acid on the growth of MT-4, MOLT-4, CEM, and Hep G2 tumor cells*. Russian J. Bioorg. Chem, 33, 579-583.
- Sorokina, I.V., Tolstikova, T.G., Zhukova, N.A., Petrenko, N.I., Shults, E.E., Uzenkova, N.V., Grek, O.R., Pozdnyakova, S.V. and G.A. Tolstikov (2004). *Betulonic acid and derivatives, a new group of agents reducing side effects of cytostatics*. Doklady Biol. Sciences, 399, 434-437.
- Trager, W. and J.B. Jensen (1976). *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 193, 673-675.
- Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G. and O.B. Flekhter (2006). *Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: I. Natural Lupane Derivatives*. Russian J. Bioorg. Chem, 32, 37-49.
- Tolstikov, G.A., Baltina, L.A., Shults, E.E. and A.G. Pokrovskii (1997). *Glycyrrhizic acid*. Rus. J. Bioorg. Chem., 23, 625-642.
- Wick, W., Grimm, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J. and M. Weller (1999). *Betulonic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing*. J Pharmacol Exp. Ther. 289, 1306-1312.
- World Health Organization (2004). *The global burden disease: 2004 update*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, pp. 10.
- Yogeeswari, P. and D. Sriram (2005). *Betulonic acid and its derivatives: A review on their biological properties*. Curr. Med. Chem. 12, 657-666.
- Ziegler, H.L., Franzyk, H., Sairafeanpour, M., Tabatabai, M., Tehrani, M.D., Bagherzaden, K., Hagerstrand, H., Stek, D. and J.W. Jaroszewski (2004). *Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure-activity relationships for betulonic acid analogues*. Bioorg. Med. Chem. 12, 119-127.

Zuco, V., Supino, R., Righetti, S.C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C. and F. Formelli (2002). *Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells*. Cancer Lett. 175, 17-25.

4.3 DATOS ESPECTROSCÓPICOS DEL ÁCIDO BETULÍNICO Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS.

Las señales características en el espectro de ^1H -RMN del ácido betulínico, así como de sus derivados semisintéticos, se muestran en las figuras 4.2 y 4.3.

4.3.1 Ácido betulínico (1)

Agujas incoloras; solubles en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; R_f 0.5 (Hx/An 7:3); IR (CHCl_3 , film): 3462 cm^{-1} (O-H), 3078 cm^{-1} (C-H sp^2), 2945 y 2863 cm^{-1} (C-H sp^3) y 1690 cm^{-1} (C=O); ^1H -RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz) δ 0.68 (1H, d, $J=9.3$, H-5), 0.72 (3H, s, H-23), 0.77 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-24), 0.92 (3H, s, H-27), 1.15 (1H, m, H-21a), 1.25 (1H, m, H-9), 1.38 (6H, m, H-6a, H-7a, H-11a, H-12a, H-15a, H-16a), 1.58 (5H, m, H-6b, H-2ab, H-21b, H-13), 1.67 (3H, s, H-29), 1.91 (2H, m, H-15b, H-22b), 2.24 (3H, m, H-16b, H-7b, H-13), 3.01 (1H, ddd, $J=4.8, 10.8, 10.8\text{ Hz}$, H-19), 3.11, (1H, dd, $J=5.3, 10.8\text{ Hz}$, H-3), 4.56 (1H, sa, H-30a), 4.69 (1H, sa, H-30b); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) 15.1 (C-27), 15.9 (C-23), 16.4 (C-25), 16.6 (C-26), 19.1 (C-6), 19.5 (C-29), 21.7 (C-11), 26.4 (C-12), 27.6 (C-2), 28.4 (C-24), 30.4 (C-21), 31.4 (C-15), 33.1 (C-16), 35.2 (C-7), 37.9 (C-22), 38.0 (C-10), 39.2 (C-13), 39.6 (C-1), 39.7 (C-4), 41.5 (C-8), 43.2 (C-14), 48.0 (C-19), 50.1 (C-18), 51.5 (C-9), 56.4 (C-5), 57.1 (C-17), 79.3 (C-3), 110.0 (C-30), 151.5 (C-20), 179.9 (C-28) ppm; ESI-HRMS m/z 440.3690 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} + 2$) (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$: 440.3654).

4.3.2 Acetato del ácido betulínico (2)

Agujas incoloras; soluble en CH_2Cl_2 y CHCl_3 ; R_f 0.65 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2); IR (CHCl_3 , film): 2946 , 2870 cm^{-1} (C-H sp^3), 1722 , 1693 cm^{-1} (C=O) y 1374 cm^{-1} (C-H); ^1H -RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 400 MHz) δ 0.75 (3H, s, H-23), 0.78 (3H, s, H-26), 0.91 (6H, s, H-25, H-24), 0.93 (3H, s, H-27), 1.69 (3H, s, H-29), 2.04 (3H, s, H-32), 3.00 (1H, ddd, $J=4.8, 10.8, 10.8\text{ Hz}$, H-19), 4.46 (1H, dd, $J=5.8, 10.6\text{ Hz}$, H-3), 4.61 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$, H-30a) y 4.74 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$, H-30b); ESI-HRMS: m/z 439.3556 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}$) (Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_2$: 439.3576).

4.3.3 Ácido betulónico (3)

Polvo blanco; soluble en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; R_f 0.65 (Hx/An 7:3); IR (CHCl_3 , film): 3308 cm^{-1} (O-H amplio), 3073 cm^{-1} (C-H sp^2), 2945 , 2878 cm^{-1} (C-H sp^3), 1700 cm^{-1} (C=O), 1644 cm^{-1} (C=C) y 1460 cm^{-1} (C-OH). ^1H -RMN

(CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz) δ 0.92 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-24), 1.06 (3H, s, H-27), 1.69 (3H, s, H-29), 3.00 (1H, m, H-19), 4.61 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-30a) y 4.74 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-30b).

4.4.4 Ester metílico del ácido betulínico (4)

Polvo amarillento; soluble en CH₂Cl₂ y CHCl₃; R_f 0.65 (Hx/An 8:2); IR (CHCl₃, film): 3523 cm⁻¹ (O-H), 3078 cm⁻¹ (C-H sp²), 2924, 2868 cm⁻¹ (C-H sp³), 1721 cm⁻¹ (RCOOR); ¹H-RMN (CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz) δ 0.66 (1H, d, J = 9.1 Hz, H-5), 0.74 (3H, s, H-23), 0.79 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-25), 0.95 (6H, s, H-24, H-27), 1.67 (3H, s, H-29), 2.99 (1H, ddd, J = 4.5, 11.0, 11.0 Hz, H-19), 3.10 (1H, dd, J = 4.9, 11.24 Hz, H-3), 3.66 (3H, s, H-31), 4.53 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-30a) y 4.66 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-30b).

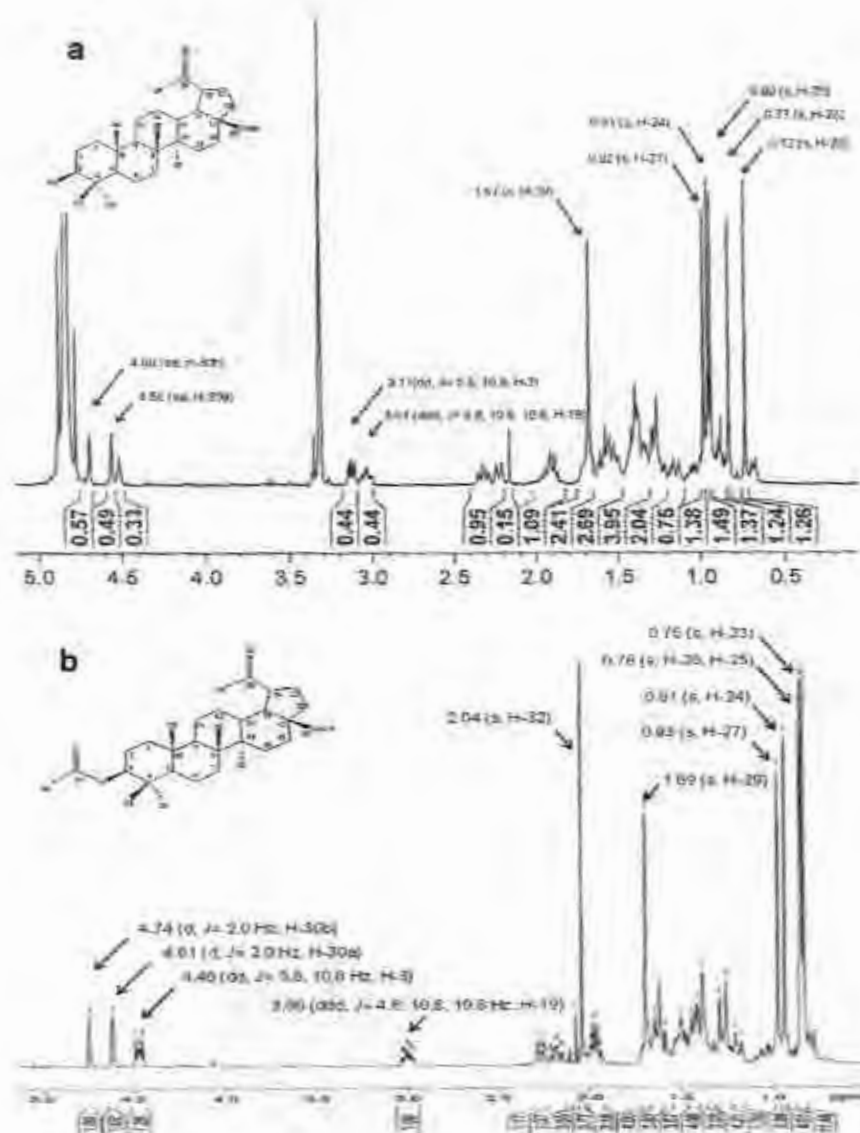


Figura 4.2. Espectros de ^1H -RMN de ácido betulínico (a) y acetato del ácido betulínico (b).

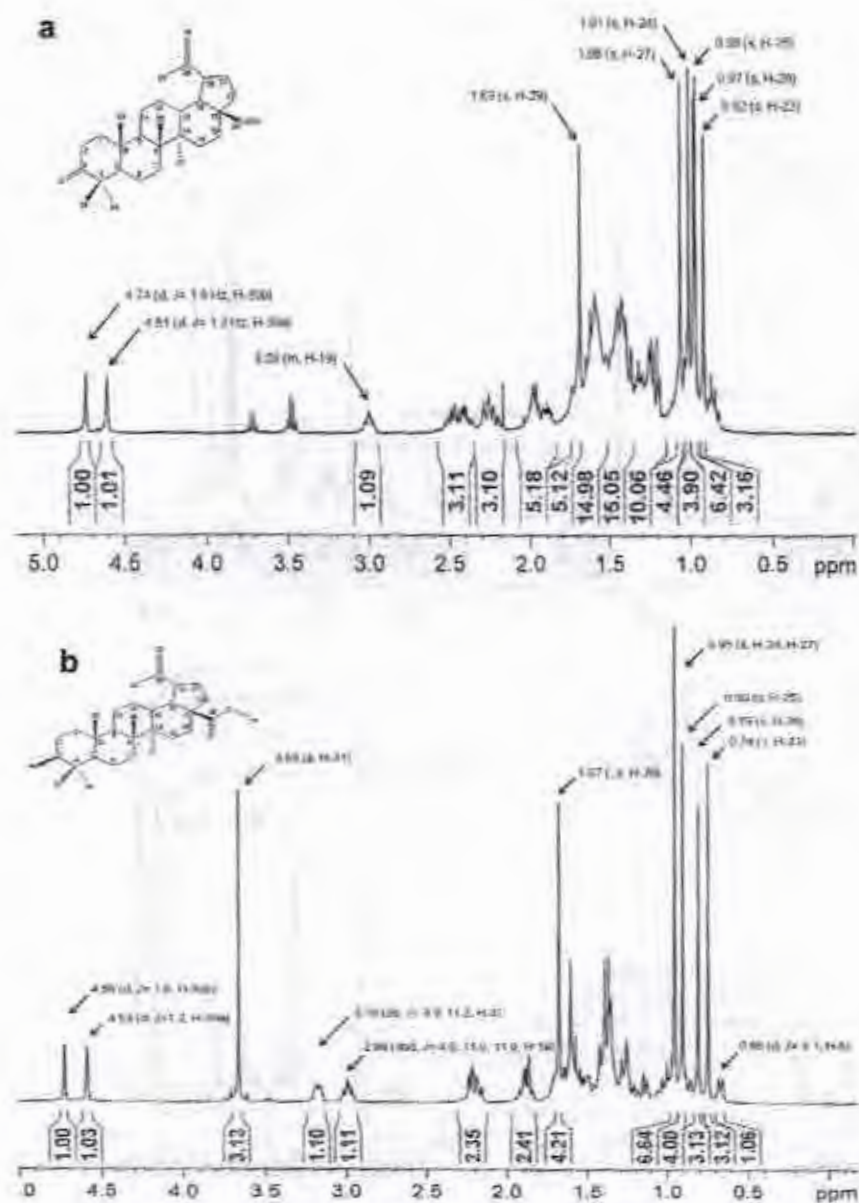


Figura 4.3. Espectros de ^1H -RMN de ácido betulónico (a) y ester metílico del ácido betulónico (b).

CAPÍTULO 5

Metabolitos de *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* y evaluación de su actividad antiprotozoaria y citotóxica.¹

5.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

En el capítulo 1 se reportó la presencia de actividad leishmanicida en las fracciones semipurificadas de polaridad baja y media del extracto de raíz de *C. greggii*; en este capítulo se describe el aislamiento e identificación del ácido 3-O-acetilceanótico como un nuevo producto natural con esqueleto ceanotano, además de cinco metabolitos previamente reportados, identificados como ácido ceanótico, ácido ceanoténico, ácido betulínico, discarina B y crisofaneína, obtenidos de estas fracciones bioactivas. La evaluación de la actividad antiprotozoaria de los productos naturales y los ésteres semisintéticos acetilceanotato de dimetilo, ceanotato de dimetilo y crisofaneína peracetilada, mostraron que el ácido 3-O-acetilceanótico, el ceanotato de dimetilo, el ácido ceanoténico y la crisofaneína peracetilada poseen una moderada actividad leishmanicida, en tanto que la crisofaneína peracetilada mostró el mayor índice de selectividad de los productos evaluados. Por otra parte, los resultados también mostraron que el ácido 3-O-acetilceanótico, el ácido ceanoténico, el ácido betulínico, y la discarina B, la crisofaneína y la crisofaneína peracetilada poseen una baja actividad tripanocida. Asimismo, los resultados mostraron que la presencia de los grupos oxhidrilo en C-3 y carbonilo en C-28 del esqueleto de los ceanotanos no es esencial para la expresión de actividad leishmanicida y tripanocida. Por otra parte, la evaluación de la actividad citotóxica y antiproliferativa de los diferentes productos reveló que ninguno de los metabolitos posee estas actividades. Los resultados de la evaluación de la actividad antiplasmódica indicaron que el ácido betulínico contribuye a la actividad antiplasmódica originalmente detectada en el extracto crudo de raíz de *C. greggii* var. *yucatanensis*. Adicionalmente, se anexan las principales características en los espectros de RMN del ácido 3-O-acetilceanótico y discarina B (sección 5.3).

¹ Este capítulo forma parte del manuscrito "Metabolites from roots of *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* and evaluation of their antiprotozoan and cytotoxic activity" recientemente sometido para publicación al Journal of Brazilian Chemical Society.

5.2 METABOLITES FROM ROOTS OF *COLUBRINA GREGGII* VAR. *YUCATANENSIS* AND EVALUATION OF THEIR ANTIPROTOZOAN AND CYTOTOXIC ACTIVITY[†]

Dafne-Berenice Domínguez-Carmona,^a Fabiola Escalante-Erosa,^a Karlina García-Sosa,^a Grace Ruiz-Pinell,^b David Gutierrez-Yapu,^b Manuel-Jesús Chan-Bacab,^c Rosa-Esther Moo-Puc,^d Nigel C. Veitch,^e Alberto Giménez-Turba,^b and Luis-Manuel Peña-Rodríguez.^a

^a Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43, No. 130, Col. Chuburná, Mérida, Yucatán, 97200 México. ^b Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés (IIFB-UMSA), Av. Saavedra 2224, La Paz, Bolivia. ^c Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche, Agustín Melgar s/n, Campeche, Campeche, México. ^d Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez IMSS, Calle 41 No. 439, Col. Industrial, Mérida, Yucatán, 97150 México. ^e Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AB UK.

5.2.1 Abstract

Purification of the root extract of *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* resulted in the isolation and identification of 3-O-acetyl ceanothic acid as a new natural ceanothane triterpene, together with the five known metabolites ceanothic acid, ceanothenic acid, betulinic acid, discarine B, and chrysophanein. The natural products, and the semisynthetic esters acetyl dimethyl ceanothate, dimethyl ceanothate, and chrysophanein peracetate, showed moderate to low leishmanicidal and trypanocidal activities. None of the metabolites proved to be cytotoxic or to have antiproliferative activity. The results also suggested that betulinic acid contributes to the antiplasmodial activity originally detected in the crude root extract of *C. greggii* var. *yucatanensis*.

Key words: *Colubrina greggii* var. *yucatanensis*; Rhamnaceae; Leishmanicidal; Trypanocidal; Antiplasmodic; Cytotoxic; Antiproliferative; Ceanothane.

[†] Este manuscrito ha sido sometido para su publicación al Journal of the Brazilian Chemical Society.

[†] corresponding author; Tel. +52-999-9428330 ext 159; Fax: +52-999-9813900; e-mail: lmanuel@cicy.mx

5.2.2 Introduction

Leishmaniasis, trypanosomiasis, and malaria are a group of protozoan diseases considered of significant importance due to their incidence and rate of mortality in developing countries (WHO, 2004). The low effectiveness, limited availability and high toxicity of existing treatments for these illnesses emphasize the importance of continuing the search for new and better antiprotozoan pharmaceuticals (Ioset, 2008).

The relevant role played by natural products in the development of new drugs, or models for them, is widely recognized (Newman & Cragg, 2007; Baker *et al.*, 2007; Butler, 2008); at the same time, plants are considered as an important source of biologically active natural products (Fabricant & Farnsworth, 2001), including a number of them with antiprotozoan activity (Sepúlveda-Boza & Cassels 1996; Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001; Saxena *et al.*, 2003).

Phytochemical studies of the genus *Colubrina* (Rhamnaceae), which has 31 species (Johnston, 1971), report a wide structural diversity of metabolites, including ansa macrolides, saponins, aporphinic alkaloids, phenolic acids, flavones, and triterpenoid acids (Wani *et al.*, 1973a, 1973b; Roltman & Jurd, 1978; Guinaudeau *et al.*, 1981; Baxter *et al.*, 1988; Oulad-All *et al.*, 1994; Elsohly *et al.*, 1999; Xing-Gong *et al.*, 1999). To date, only chrysophanol, an anthraquinone with antimicrobial activity, has been reported as a metabolite from *C. greggii* (García-Sosa *et al.*, 2006).

During the screening of extracts from native yucatecan medicinal plants as potential sources of bioactive metabolites, the root extract of *Colubrina greggii* S.Watson var. *yucatanensis* M.C. Johnst., a shrub used for the treatment of liver diseases, ulcerations, abscesses, asthma and tuberculosis (Mendieta *et al.*, 1981), showed trypanocidal, antimalarial, leishmanicidal and cytostatic activity (Vera-Kú, 2004; Getti *et al.*, 2009).

Continuing our search for bioactive metabolites from the native flora of the Yucatan peninsula, we report herein on the leishmanicidal, trypanocidal, antiparasitic, cytotoxic and antiproliferative activity of the crude extract, the semi-purified fractions and the isolated metabolites from the root extract of *C. greggii* var. *yucatanensis*.

5.2.3 Results and discussion

Initial fractionation of the bioactive root extract of *C. greggii* var. *yucatanensis* yielded a low and a medium-polarity fractions, both with leishmanicidal activity. Successive purification of the medium-polarity fraction resulted in the isolation of 3-O-acetyl-ceanoth-20(30)-en-1,28-dioic acid (3-O-acetyl ceanothic acid, **1**) as a new natural ceanothane triterpene, together with the known metabolites ceanothic acid (**2**), discarine B (**7**) and chrysophanein (**8**). Similarly, purification of the low-polarity fraction led to the isolation and identification of ceanothenic acid (**5**) and betulinic acid (**6**) (Fig. 5.1).

The IR spectrum of **1** showed absorption bands at 3073 (sp^2 -hybridized C-H), 1731 (ester carbonyl) and 1681 cm^{-1} (carboxyl carbonyl) and a sodium adduct of the molecular ion peak [$M^+ + Na$] at m/z 551 in its HRMS, indicating a molecular formula of $C_{32}H_{48}O_5$. The nature of the carbons in the structure, established through the analysis of the HMQC and DEPT experiments, was established as seven methyl groups, nine methylenes, seven methynes, and nine quaternary carbons. The 1H -NMR spectrum of **1** contained seven three-proton singlets (0.88, 0.98, 0.99, 1.06, 1.16, 1.68 and 2.03 ppm) indicating that all methyl groups were attached to quaternary carbons; additionally the lower field methyl group singlets at 1.68 and 2.03 ppm were assigned to isopropenyl and acetyl groups, respectively. The presence of a disubstituted double bond in the structure of **1** was confirmed by the two vinylic proton signals at 4.58 and 4.70 ppm; while the acetyl group was confirmed by an ester-carbonyl carbon (δ 172.5) in its ^{13}C -NMR. The double bond and three carbonyl groups observed in the ^{13}C -NMR of **1** (δ 172.5, 177.4 and 180.1 ppm) accounted for four of the nine unsaturation sites implied by the molecular formula, and indicated that the five remaining unsaturation sites corresponded to a pentacyclic structure. The spectroscopic data of **1** (Table 5.2, Figure 5.2) proved to be very similar to those reported for ceanothic acid (**2**), a ceanothane triterpene originally isolated from *Ceanothus americanus* (Julian *et al.*, 1938) and later identified from *Colubrina granulosa* (Roitman & Jurd, 1978). However, the presence of a low-field carbinol proton in the 1H -NMR spectrum of **1**, which showed strong HMBC correlations to both the ester carbonyl carbon (δ 172.5) and the acetyl methyl singlet at 2.03 ppm, strongly suggested that **1** was the 3-O-acetyl derivative of **2**. This was confirmed when acetylation of **2** produced **1** as the only product. Furthermore, the presence of **1** in the original root extract from *C. greggii*, as detected by TLC (Figure 5.3), ruled out its being

an artifact of the isolation procedure and confirmed it as a new natural product.

Discarine B (7), chrysophanein (8), and ceanoltheric acid (5) were identified by analyzing their spectroscopic data (Table 4.2, 4.3) and comparing it with those reported in the literature (Gournelis *et al.*, 1998; Kubo *et al.*, 1992; de Mayo *et al.*, 1982). Betulinic acid (6) was identified by comparing its TLC behaviour with that of an authentic sample, and by comparing its ^{13}C NMR data with those reported in the literature (Mehato & Kundun, 1994). It is important to mention that metabolites 1 and 2 were initially characterized as their corresponding methyl-ester derivatives 3 and 4, while 8 was identified as its peracetylated derivative 9 (Figure 5.1.; Table 5.2, 5.3).

All of the isolated metabolites, together with the semisynthetic esters acetyl-dimethyl ceanothate (3), dimethyl ceanothate (4), and chrysophanein peracetate (9), were evaluated for their *in vitro* antiprotozoan (leishmanicidal, trypanocidal, and antiplasmodial), cytotoxic, and antiproliferative activities. The results showed that the natural ceanothanes 1 and 5, and the semisynthetic derivatives 4 and 9, have moderate leishmanicidal activity (IC_{50} values of 20-28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); similarly, only the natural products 5-8, as well as the semisynthetic esters 3 and 9, showed a low trypanocidal activity (IC_{50} of 30-70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The evaluation of the antiplasmodial activity of the various metabolites and derivatives showed that betulinic acid 6 (IC_{50} 9.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) appears to contribute to the antiplasmodial activity of the crude extract of *C. greggii*; this is in agreement with results previously reported in the literature (Duker-Eshun *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2004).

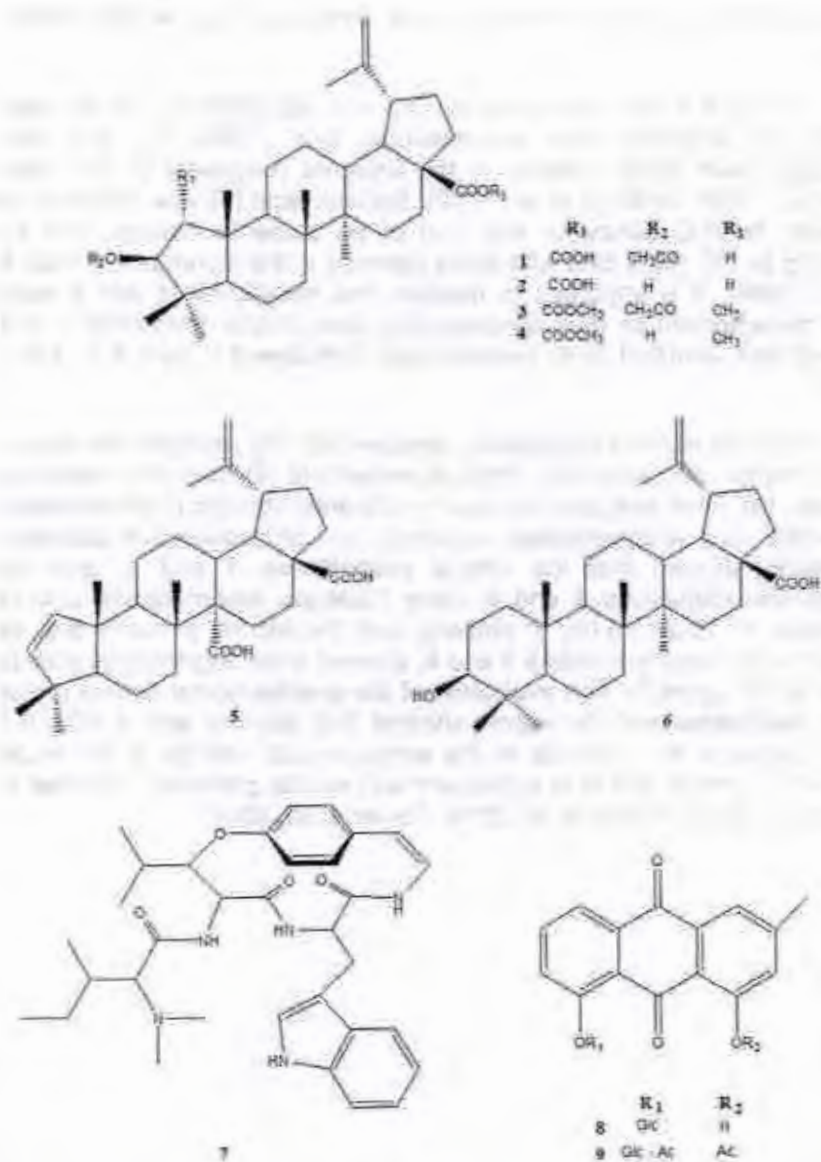


Figure 5.1. Structures of the natural and semisynthetic derivatives compounds from *C. greggii*.

Even though the crude root extract, together with the low and medium polarity fractions of *C. greggii*, showed cytotoxic activity against HeP-2 cells, none of the isolated metabolites showed this type of activity (Table 5.4). These results are in agreement with those reporting a limited biological activity for ceanothic acid (**2**) (Lee *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Suksamram *et al.*, 2006). Furthermore, none of the metabolites tested, with the exception of the peracetylated chrysophanein (**9**) with a low activity, showed antiproliferative activity against KB cells. It is interesting to point out that the cytotoxic activity of *C. macrocarpa* and *C. texensis* has been attributed to the presence of colubrinol and its acetate (Wani *et al.*, 1973a; Popoca *et al.*, 1998), however these metabolites were not detected in the root extract of *C. greggii*.

Although the activity of the ceanothic acid derivatives **1** and **4** suggests that the presence of an acetyl and/or methyl group in the parent structure **2** favors leishmanicidal activity (Table 5.1), the similar values of **2** and **3** indicate that neither the carboxyl or hydroxyl groups are essential for the expression of antiprotozoan activity. Alternatively, peracetylation of chrysophanein (**8**) produced the corresponding semisynthetic ester **9** with an improved leishmanicidal activity, and a considerable selectivity index (9.7, Table 5.1).

Table 5.1 Leishmanicidal, trypanocidal, antiplasmodial and cytotoxic activity [IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] of crude extract, fractions and pure compounds from *C. greggii*.

Extract/ Compounds	ANTIPROTOZOAN ACTIVITY					
	<i>L. amazonensis</i>		<i>T. cruzi tulahuén</i>		<i>P. falciparum</i>	VERO
	IC_{50}	SI	IC_{50}	SI	IC_{50}	IC_{50}
CG-1	32.4	—	>100	—	8	NT
CG-2A	< 25	—	73.8	—	4.5	NT
CG-2B	< 25	—	>100	—	> 10	NT
1	28.2 $\pm$ 2.7	3.6	>100	—	>10	103.1 $\pm$ 1.8
2	46.4 $\pm$ 8.4	2.8	>100	—	NT	131.2 $\pm$ 3.2
3	40.2 $\pm$ 9.8	—	56.2 $\pm$ 5.2	—	NT	NT
4	20.6 $\pm$ 6.8	—	>100	—	NT	NT
5	22.1 $\pm$ 2.7	4.4	64.0 $\pm$ 4.3	1.5	NT	98.6 $\pm$ 1.2
6	>100	—	34.2 $\pm$ 11.1	4.2	9.7	145.0 $\pm$ 2.9
7	>100	—	56.2 $\pm$ 3.2	3.6	>10	199.1 $\pm$ 2.7
8	>100	—	56.7 $\pm$ 19.5	9.1	>10	521.0 $\pm$ 6.3
9	12.7 $\pm$ 1.1	9.7	65.3 $\pm$ 9.0	1.8	>10	123.6 $\pm$ 4.2
Pentamidine	10.0 $\pm$ 0.8	—	—	—	—	NT
Benznidazole	—	—	7.4 $\pm$ 0.5	—	—	NT
Chloroquine	—	—	—	—	0.1 $\pm$ 0.02	NT

SI: Selectivity index were calculated as the ratio IC_{50} of cytotoxic activity in VERO cells/ IC_{50} of antiprotozoan activity

To date, ceanothane triterpenes have only been reported to occur in species of the Rhamnaceae family (Jullian *et al.*, 1938; de Mayo *et al.*, 1962; Eade *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003; Suksamrarn *et al.*, 2006; Gulacomelli *et al.*, 2007), and particularly in those belonging to the ziziphoids in the tribal classification reported by Richardson *et al.* (2000). These results, together with our finding of ceanothanes in the root extract of *C. greggii*, support the possible use of this class of triterpenes as chemotaxonomic markers for classification in the phylogenetic analysis of the Rhamnaceae family.

5.2.4 Experimental

5.2.4.1 General experimental procedures

Analytical TLC was carried out using aluminum-backed silica gel (60F₂₅₄) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness). The various components in the chromatograms were visualized using a solution of phosphomolibdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%). Flash chromatography purifications were performed using silica gel (200-400 mesh) from Aldrich, while TLC-grade silica gel 60GF₂₅₄ (E.M. Merck) was used for vacuum liquid chromatography (VLC). Prep-TLC purifications were carried out using glass plates impregnated with silica gel 60 F₂₅₄ (E.M. Merck, 0.25 mm thickness, 20 x 20 cm). The optical rotations were measured in CHCl₃ using a Perkin Elmer 341 polarimeter. Melting points (uncorrected) were determined from a Mel-Temp II apparatus (Laboratory Devices Inc.). IR spectra were recorded in CHCl₃ or MeOH (film) using an FT-Nicolet Magna Protégé 460 spectrophotometer. ¹H NMR (400 and 600 MHz) and ¹³C NMR (100 and 150 MHz) spectra were acquired on a Bruker Avance 400 spectrometer or a Bruker Avance 600 spectrometer with CHN cryoprobe, respectively, using the residual solvent resonances as internal references, calibrated to TMS (0.00 ppm). Electro-spray high-resolution mass spectra (ESI-HRMS) were determined by direct injection on a Waters Q-TOF microsystem (using 0.1% phosphoric acid in a 1:1 water/acetonitrile mixture as reference) or using an Orbitrap MS (Thermo) connected to a Surveyor HPLC (Thermo) to inject the samples.

5.2.4.2 Plant material

Roots of *Colubrina greggii* S. Watson var. *yucatanensis* M.C. Johnst. were collected in Abalá, Yucatán, México and a voucher specimen (P. Simá-D. Domínguez 2916) was deposited in the Herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán.

5.2.4.3 Extraction of plant material and purification of crude extract

Dry roots of *C. greggii* (365g) were extracted three times with ethanol (4 L) at room temperature. Evaporation of the solvent yielded the corresponding crude extract (**CG-1**, 54.5g, 14.9%), which was suspended in 1.8 L of a H₂O/MeOH (3:2, v/v) mixture; the resulting suspension was fractionated by successive liquid-liquid partition with hexane (3×, 2:1, 1:1, 1:1), ethylacetate (3×, 2:1, 1:1, 1:1) and butanol (1:2) to produce the corresponding low (**CG-2A**), medium (**CG-2B**) and high (**CG-2C**) polarity fractions. Purification of the medium polarity fraction (**CG-2B**, 9.6 g) by VLC, using a gradient elution with CH₂Cl₂/Me₂CO (99:1-94:6) followed by CHCl₃/hexane/MeOH (70:25:5), yielded fractions **CG-5A-N**. Fraction **CG-5E** (550 mg) was purified by flash chromatography using an isocratic elution with hexane/Me₂CO 8:2, to produce pure 3-O-acetyl-ceanothic acid (**1**, 172.1 mg) and fraction **CG-6I** (50 mg), which was further purified by column chromatography [ether/hexane (1:1)] to produce ceanothic acid (**2**, 16.5 mg) in pure form. Additional purification of fraction **CG-5C** (414 mg) by flash chromatography, using a gradient elution with hexane/ Me₂CO (8:2-7:3), resulted in the isolation of discarine B (**7**, 108 mg). Finally, chrysophanein (**8**, 168.5 mg) was collected as a yellow precipitate by filtration from fraction **CG-5G**. Purification of the low polarity fraction (**CG-2A**, 1.5g) by VLC, using a gradient elution with mixtures of hexane/Me₂CO/MeOH (95:3:2 to 60:38:2, produced eleven fractions (**CG-3A-K**). Fractions **CG-3E-F** were combined (500 mg) and purified by flash chromatography (hexane/ether 7:3) to yield ceanothenic acid (**5**, 20.8 mg) and betulinic acid (**6**, 20.4 mg).

5.2.4.4 3-O-acetyl-ceanothic acid (**1**)

White amorphous solid; mp: 271.5-273.1 °C; $[\alpha]_D^{20} + 33.72^\circ$ (c 0.01, Me₂CO); IR (film) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3073 (CH=C), 2929, 2873 (CH-C), 1731, 1685 (>C=O); ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) and ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) data: see table 5.2; ESI-HRMS m/z 551.3524 [M+Na]⁺ (calc. for C₃₂H₄₈NaO₆: 551.3584).

5.2.4.5 Ceanoctic acid (**2**)

White amorphous solid; $[\alpha]_D^{20} + 30.82^\circ$ (c 0.003, MeOH); IR (film) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3411 (OH), 2942, 2873 (CH-C), 1697 (>C=O); ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 0.88 (3H, s, H-24), 0.90 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-25), 1.35 (3H, s, H-23), 1.67 (3H, s, H-29), 2.45 (1H, s, H-1), 3.06 (1H, m, H-19), 4.06 (1H, s, H-3), 4.57 (1H, br. s, H-30a), 4.69 (1H, br. s, H30b); ESI-HRMS m/z 487.3418 [M+H]⁺ (calc. for C₃₀H₄₇O₅: 487.3418).

5.2.4.6 3-O-acetyl-dimethyl-ceanothate (3)

A mixture of **1** (5.1 mg), K_2CO_3 (60 mg), CH_3I (300 μ L) and acetone (1 mL) was stirred for 72 h at room temperature. The reaction mixture was poured over distiller water (14 mL) and the resulting suspension was extracted twice with EtOAc (4:1, v/v); the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to produce 4.6 mg (87.7%) of the crude esterified product, which was purified by column chromatography (hexane/ Me_2CO 9:1) to give **3** (4.2 mg, 91.3% yield) as a white powder. 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) and ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) data: see table 5.2; LR-MS m/z 557 $[M+H]^+$

5.2.4.7 Dimethyl-ceanothate (4)

A fraction containing ceanothic acid as the main product (8.5 mg), was mixed with K_2CO_3 (220 mg), CH_3I (800 μ L) and acetone (1 mL) and then stirred for 72 h at room temperature. The reaction mixture was poured over distilled water (13 mL) and the resulting suspension was extracted twice with EtOAc (4:1, v/v); the organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to produce 9.6 mg of the crude esterified product which was purified by multiple-elution (5 $\times$) prep-TLC (hexane/ether 7:3) to give **4** (56.2%) as a white solid. 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) and ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) data: see table 5.2; ESI-HRMS m/z 515.3731 $[M+H]^+$ (calc. for $C_{32}H_{51}O_9$: 515.3731).

5.2.4.8 Ceanothenic acid (5)

White powder; IR (film) ν_{max} cm^{-1} : 3067 (CH=C), 2959, 2868, 2730 (CH-C), 1721, 1685 ($>C=O$); 1H NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 9:1, 400 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 9:1, 100 MHz) see table 5.2; ESI-HRMS m/z 455.3156 $[M+H]^+$ (calc. for $C_{25}H_{43}O_4$, 455.3156).

5.2.4.9 Betulinic acid (6)

Colorless needles; IR (film) ν_{max} 3462 (OH), 3078 (CH=C), 2945, 2863 (CH-C), 1690 ($>C=O$). ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) 15.1 (C-27), 15.9 (C-23), 16.4 (C-25), 16.6 (C-26), 19.1 (C-8), 19.5 (C-30), 21.7 (C-11), 26.4 (C-12), 27.6 (C-2), 28.4 (C-24), 30.4 (C-21), 31.4 (C-15), 33.1 (C-16), 35.2 (C-7), 37.9 (C-22), 38.0 (C-10), 39.2 (C-13), 39.6 (C-1), 39.7 (C-4), 41.5 (C-8), 43.2 (C-14), 48.0 (C-19), 50.1 (C-18), 51.5 (C-9), 56.4 (C-5), 57.1 (C-17), 79.3 (C-3), 110.0 (C-29), 151.5 (C-20), 179.9 (C-28) ppm; ESI-HRMS m/z 440.3690 ($M^+ - H_2O + 2$) (calc for $C_{30}H_{48}O_2$: 440.3654).

5.2.4.10 Discarine B (7)

White amorphous solid; $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3267, 3027 (CH=C), 2960, 2934, 2873 (CH-C), 1634 (>C=O); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 30 °C, 400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 30 °C, 100 MHz) data: see table 5.4; ESI-HRMS m/z 574.3393 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4$, 574.3393).

5.2.4.11 Chrysophanein (8)

Yellow powder; IR (film) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3344 (OH), 2914, 2842 (CH-C), 1634 (>C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 100 MHz) data: see table 5.3; ESI-HRMS m/z 255.2302 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 255.2324).

5.2.4.12 Chrysophanein peracetate (9)

A mixture of **8** (10 mg), acetic anhydride (1 mL) and pyridine (0.5 mL) was allowed to stir at room temperature for 72 h. The reaction mixture was poured over distilled water (20 mL) and the resulting suspension was extracted twice with ethylacetate (2:1 v/v). The organic layer was washed successively with equal volumes of HCl (5%), NaOH (3%), H_2O , and NaCl satd., and then dried over anhydrous Mg_2SO_4 . Filtration and evaporation of the solvent yielded 13.9 mg (92.4%) of crude acetylated product obtained as a yellow powder; IR (film) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3021 (CH=C), 2919, 2847 (CH-C), 1757, 1680 (>C=O); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): see table 5.3; ESI-HRMS m/z 649.1499 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{NaO}_{14}$, 649.1635).

5.2.4.13 Bioassays

5.2.4.13.1 Leishmanicidal assay

The growth inhibition of promastigotes was carried out following the procedure previously reported by Muñoz *et al.*, 1994 and Inchausti *et al.*, 1997. Briefly, a strain of *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8) was grown in Schneider culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU·mL $^{-1}$) and streptomycin (100 mg·mL $^{-1}$) at 25 °C; parasites in the log phase of their growth cycle were then transferred to a microplate (96 wells; 1×10^5 parasites/well). Stock solutions of DMSO (blank), pentamidine (positive control), crude extract, semipurified fractions and pure metabolites were diluted in Schneider medium at $\leq 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, added to the plate, and incubated for 72 h. The percentages of inhibition were obtained by directed

observation of each well with an inverted phase microscope. All the assays were carried out in triplicate.

5.2.4.13.2 Trypanocidal assay

Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* strain Tulahuen parasites were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 5% FBS, following the procedure modified by Chataing *et al.* (1998). Briefly, parasites in the log phase of growth cycle were transferred to a microplate (96 wells; 1×10^5 parasites/well) together with stock solutions of benznidazole, DMSO (positive control and blank respectively), extract, semipurified fractions or pure metabolites prepared at different concentrations ($\leq 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The microplates were incubated at 26 °C for 72 h.

5.2.4.13.3 Antiplasmodial assay

Plasmodium falciparum strain F32 was grown at 37 °C in RPMI medium with 10% of human serum and 4% of hematocrite (Q, Rh+), under anaerobic conditions, according to the reported method (Trager & Jensen, 1976). Cultures with 1% parasitemic and 2% hematocrite (100 μL) were transferred to a 96 well plate. Stock solutions of chloroquine (positive control), DMSO (blank), extract, semipurified fractions or pure metabolites were diluted in RPMI medium to a concentration of $<10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and added to each well. The plate was then incubated at 37 °C for 48 h.

5.2.4.13.4 Cytotoxicity assay

Human laryngeal carcinoma (HEP-2), human cervical adenocarcinoma (HeLa), human nasopharyngeal carcinoma (KB) and green monkey Vero kidney cells (VERO) were grown in DMEM (Gibco) media supplemented with 10% (v/v) FBS (Gibco), with penicillin ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) streptomycin ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). All the cell lines were maintained at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere with 95% humidity. The cytotoxicity assay was performed according to the method reported by Rahman *et al.*, (2001). Briefly, cell lines were transferred to a microplate (1.5×10^4 viable cells of each cell line) and incubated at 37 °C, with 95% humidity and 5% CO_2 in DMEM medium supplement with 10% of FBS, penicillin (10 000 UI), streptomycin ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and amphotericine B ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). After 24 h, the medium was replaced by fresh medium with 0.05% DMSO (blank) or different concentrations of docetaxel (positive control, Sigma), extract, semipurified fractions or pure metabolites dissolved in DMSO (100, 50, 25,

12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and the cells were incubated for 72 h under the conditions already described. The medium was removed and 200 μL of a 0.5% MTT (Sigma) solution in PBS (pH 7.2) were added to each well and left to stand for 4 h at 37° C. Then 100 μL of acidified isopropanol (0.4 N HCl) were added to each well and the optical density (OD) was measured at 540 nm using a Bio-assay reader (Bio-Rad). The experiment was carried out in triplicate and each concentration was tested in duplicate.

5.2.4.13.5. Antiproliferative assay

The sulforhodamine B (SRB) assay was carried out according to the method reported by Rahman *et al.* (2001), using DMEM medium with 10% FBS to induce cell proliferation. After 48 h of incubation, the medium was discarded and 100 μL of ice-cold 40% trichloroacetic acid (TCA, Aldrich Chemical) were added to fix the cells, incubating for 1 h at 4 °C. The cells were washed five times with water and left to dry; 50 μL of SRB stain (10 mg 1% acetic acid, Sigma) were added to each well and left to stand for 30 min. Finally the cells were washed with 50 mL 1% acetic acid, and rinsed four times with water. The OD was measured at 540 nm using an ELISA reader (Bio-Rad model 450). The experiment was carried out in triplicate.

5.2.4.13.6 Statistical analysis

Data were analyzed with a commercial software (GraphPad 4.0, Software Inc., San Diego, CA). The dose-response curves (variable slope) to obtain the inhibitory concentration (in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of 50% of parasites (IC_{50}), the growth inhibition of 50% of cells (IG_{50}), and the cytotoxic concentration of 50% of cells (CC_{50}), were fitted with the algorithm: $Y = \frac{E_{\text{max}} - E_{\text{min}}}{1 + 10(\text{Log ED}_{50} - \text{Log D}) \text{ Hill slope}}$.

5.2.5 Acknowledgements

The authors wish to thank to Paulino Simá for the identification of the plant material. This work was supported by Program CYTED (Projects X.5 and RIBIOFAR) and Project FOMIX-Yucatán (66262).

5.2.6 Support information

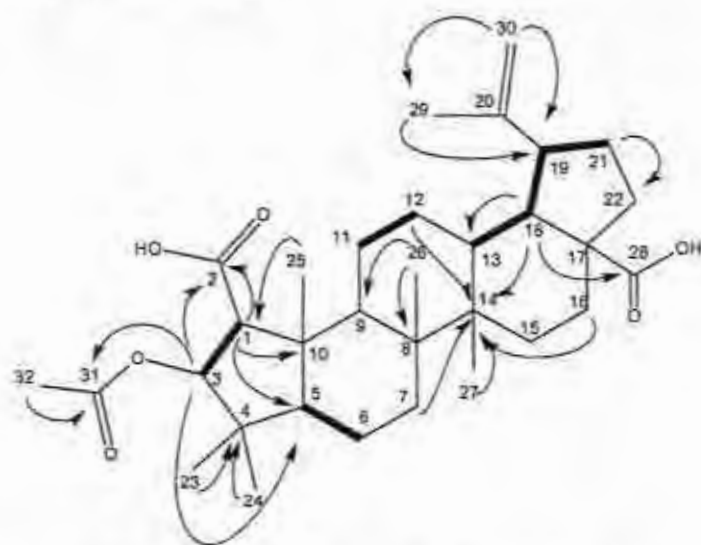


Figure 5.2. Principal H-H COSY couplings and HMBC correlations 3-O-acetyl-ceanothic acid (1)

Table 5.2. ^{13}C and ^1H NMR data for the ceanothane compounds 3-O-acetyl ceanothic acid (1), acetyl-dimethyl ceanothate (3), dimethyl ceanothate (4) and ceanothenic acid (5) (ppm).

C/ H	1			3		4		5	
	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)	HMBC	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)
1	64.7 (d)	2.52 d (0.8)	C-2, C-3, C-5, C-10	62.9 (d)	2.59 s	65.5 (d)	2.50 s	140.1 (d)	5.55 d (5.7)
2	177.4 (s)			174.2 (s)		175.9 (s)		—	—
3	87.0 (d)	5.07 d (0.8)	C-2, C-31	85.1 (d)	5.09 s	84.9 (d)	4.97 s	138.2 (d)	5.01 d (5.0)
4	44.0 (s)			42.9 (s)		43.4 (s)		44.0 (s)	
5	57.6 (d)	1.71 m	C-10	56.2 (d)	1.66 m	56.6 (d)	1.53 m	61.0 (d)	0.86 m
6	19.5 (t)	1.43 m		18.2 (t)	1.33 m	18.6 (t)	1.27 m	16.8 (t)	1.07 m
7	35.4 (t)	1.40 m	C-14	33.8 (t)	1.33 m	34.0 (t)	1.27 m	36.9 (t)	1.25 m
8	42.9 (s)	1.97 m		41.5 (s)	1.40 m	42.9 (s)		40.7 qC	1.33 m
9	46.1 (d)	1.71 m		44.6 (d)	1.46 m	44.7 (d)	1.36 m	47.4 (d)	1.48 dd (3.2, 12.3)
10	50.6 (s)			49.4 (s)		49.5 (s)		50.0 (s)	
11	24.9 (t)	1.43 m	C-10	23.4 (t)	1.46 m	23.8 (t)	1.36 m	22.3 (t)	1.20 m
12	26.8 (t)	1.11 m	C-14	25.2 (t)	0.95 m	25.5 (t)	0.82 m	26.2 (t)	1.30 m
		1.62 m			1.60 m		1.83 m		1.74 m
13	40.1 (d)	2.27 m		38.4 (d)	2.18 td (11.0, 7.5)	38.7 (d)	2.08 m	39.0 (d)	2.02 m
14	44.3 (s)			42.7 (s)		41.7 (s)		59.3 (s)	
15	31.6 (t)	1.43 m		30.5 (t)	1.36 m	30.9 (t)	1.27 m	27.4 (t)	1.00 m
		1.90 m			1.87 m		1.80 m		1.74 m
16	33.5 (t)	1.43 m	C-14	29.7 (t)	1.13 m	32.3 (t)	1.76 m	33.7 (t)	0.86 m
		2.27 m			1.36 m		2.11 m		1.99 m
17	57.5 (s)			56.4 (s)		56.7 (s)		55.6 (s)	
18	50.5 (d)	1.62 m	C-13, C-14, C-17, C-19, C-28	49.2 (d)	1.54 t (11.4)	49.0 (d)	1.45 t (11.4)	50.9 (d)	1.36 m

Table 5.2. (cont.) ^{13}C and ^1H NMR data for the ceanothane compounds 3-O-acetyl ceanothic acid (1), acetyl-dimethyl ceanothate (3), dimethyl ceanothate (4) and ceanothenic acid (5) (ppm).

C / H	1			3		4		5	
	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)	HMBC	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C} (mult)	δ_{H} (J/Hz)
19	48.6 (d)	3.01 dt (10.8, 4.5)	C-29	46.6 (d)	2.97 dt (10.5, 4.7)	47.0 (d)	2.88 dt (10.9, 4.6)	46.6 (d)	2.72 dt (7.5, 4.0)
20	152.0 (s)			150.3 (s)		150.5 (s)		149.7 (s)	
21	31.1 (t)	1.62 m	C-22	32.1 (t)	2.23 m	30.7 (t)	1.27 m 1.80 m	29.8 (t)	1.00 m 1.57 m
22	38.3 (t)	1.43 m 1.90 m		36.9 (t)	1.38 m 1.87 m	37.0 (t)	1.27 m 1.76 m	36.5 (t)	1.00 m 1.56 m
23	30.8 (q)	1.16 s	C-3, C-4, C-5, C-24	30.2 (q)	1.19 s	29.8 (q)	1.16 s	28.6 (q)	0.59 s
24	20.1 (q)	0.68 s	C-3, C-4, C-5, C-23	19.5 (q)	0.85 s	29.9 (q)	1.03 s	20.5 (q)	0.53 s
25	16.9 (q)	1.06 s	C-1, C-5, C-9, C-10	18.0 (q)	1.02 s	14.8 (q)	0.82 s	16.3 (q)	0.60 s
26	17.2 (q)	0.98 s	C-7, C-9	16.4 (q)	0.92 s	16.5 (q)	0.97 s	17.2 (q)	0.68 s
27	15.3 (q)	0.99 s	C-9, C-13, C-14, C-15	14.8 (q)	0.91 s	16.6 (q)	0.83 s	17.5 (s)	
28	160.1 (s)			176.6 (s)		176.8 (s)		177.6 (s)	
29	19.7 (q)	1.56 s	C-19	19.4 (q)	1.67 s	19.3 (q)	1.57 s	17.9 (q)	1.32 s
30	110.3 (t)	4.58 dd (2.2, 1.4) 4.70 d (2.0)	C-19, C-29	109.6 (t)	4.60 sa 4.72 sa	109.7 (t)	4.50 sa 4.63 sa	109.1 (t)	4.22 d (2.2) 4.35 d (2.1)
C=O	172.5 (s)			170.5 (s)					
Me	21.0 (q)	2.03 s	C-31	21.0 (q)	2.04 s				
MeO				51.5 (q)	3.68 s	51.4 (q)	3.50 s		
MeO				51.3 (q)	3.68 s	51.4 (q)	3.50 s		

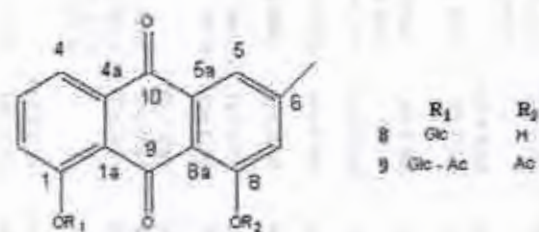
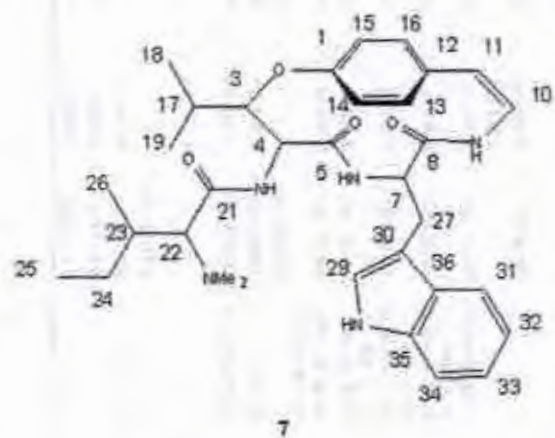
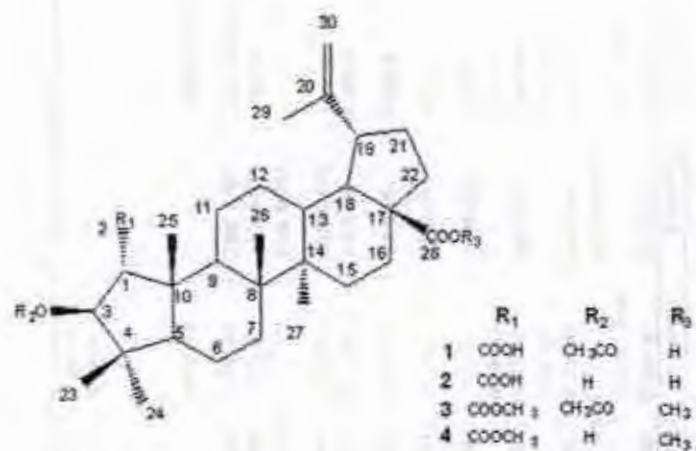


Table 5.3. ¹³C and ¹H NMR data for compounds 8 and 9.

C / H	8			9		
	δ _c (mult)	δ _H	J (Hz)	δ _c (mult)	δ _H	J (Hz)
1	147.5 (s)			149.5 (s)		
1a	114.7 (s)			123.9 (s)		
2	124.0 (d)	7.17 dd (1.0, 0.7)		130.6 (d)	7.20 dd (1.0, 0.6)	
3	118.2 (s)			145.5 (s)		
4	119.3 (d)	7.47 dd (1.6, 0.7)		125.5 (d)	7.97 dd (1.8, 0.6)	
4a	132.1 (s)			134.2 (s)		
5	120.5 (d)	7.05 m		122.1 (d)	8.00 dd (7.5, 1.2)	
5a	136.3 (s)			134.8 (s)		
6	135.8 (d)	7.85 m		134.3 (d)	7.65 dd (7.8, 7.6)	
7	122.4 (d)	7.70 dd (2.6, 1.3)		123.3 (d)	7.45 dd (6.4, 1.2)	
8	158.1 (s)			165.4 (s)		
8a	121.2 (s)			123.6 (s)		
9	167.4 (s)			180.5 (s)		
10	182.0 (s)			182.7 (s)		
1'	109.5 (d)	5.66 d (5.1)		99.8 (d)	5.13 d (7.9)	
2'	77.3 (d)	3.46 m		70.4 (d)	5.50 dd (9.3, 7.8)	2''
3'	73.3 (d)	3.86 m		72.6 (d)	5.31 dd (9.6, 9.6)	3''
4'	69.5 (d)	3.21 m		68.2 (d)	5.22 dd (9.5, 9.5)	4''
5'	76.5 (d)	3.31 m		72.2 (d)	3.80 ddd (12.3, 9.5, 2.6)	5''
6'	60.6 (d)	3.49 m			4.20 ddd (12.3, 9.5, 2.6)	
11	214.0 (s)	2.41 s		61.9 (t)	4.26 ddd (12.3, 9.5, 2.6)	
				21.6 (d)	2.49 s	

Table 5.4. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for 7 in CD_3OD at 30 °C (400 MHz).

C/H	7		
	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (J/Hz)	HMBC
1	157.7 (s)		
3	82.0 (d)	4.86 dd (8.4, 1.7)	C-1, C-4, C-5, C-17, C-18, C-19
4	56.8 (d)	4.48 d (8.4)	C-3, C-5, C-17, C-21
5	172.4 (s)		
7	55.5 (d)	4.26 dd (9.1, 5.0)	C-6, C-27, C-30
8	172.1 (s)		
10	127.0 (d)	5.97 br s	
11	131.0 (d)	6.67 br s	
12	132.4 (s)		
13/16 ^a	131.4 (d)	6.90 m	C-1
	130.4 (d)	6.96 m	C-1
14/15 ^a	122.2 (d)	6.96 m	C-12
	119.2 (d)	6.97 m	C-12
17	30.0 (d)	2.19 m	C-18, C-19
18/19 ^a	20.8 (q)	1.19 d (6.9)	C-3, C-17, C-18/19
	15.4 (q)	1.01 d (6.8)	C-3, C-17, C-18/19
21	173.2 (s)		
22	74.4 (d)	2.64 d (8.4)	C-21, C-23, C-24, C-26, NMe ₃
23	35.6 (d)	1.81 m	C-21, C-22, C-24, C-26
24	27.1 (t)	1.59 m	C-22, C-23, C-25, C-26
		1.09 m	C-22, C-23, C-25, C-26
25	11.4 (q)	0.87 t (7.4)	C-23, C-24
26	15.6 (q)	0.74 d (6.7)	C-22, C-23, C-24
NMe ₂	42.5 (q)	2.24 s	C-21, C-22
27	29.6 (t)	2.99 br dd (14.0)	
		2.74 br dd (14.0)	
29	124.7 (d)	6.99 s	C-7, C-27, C-30, C-35, C-36
30	110.4 (s)		
31	119.3 (d)	7.44 br d (7.9)	C-30, C-33, C-35, C-36
32	119.8 (d)	6.96 ddd (8.0, 7.0, 1.1)	C-31, C-34, C-36
33	122.5 (d)	7.06 ddd (8.2, 7.0, 1.2)	C-31, C-34, C-35
34	112.3 (d)	7.29 dt (8.1, 0.8)	C-32, C-36
35	138.1 (s)		
36	128.6 (s)		

^a Assignments interchangeable

Table 5.5. Cytotoxic activity [CC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] in HeLa, KB, HeP-2 and VERO cells of pure metabolites from *C. greggii* and semisynthetic derivatives.

Extract/ Compound	CYTOTOXIC ACTIVITY						
	HeLa		KB		HeP-2		VERO
	CC_{50}	SI	CC_{50}	SI	CC_{50}	SI	CC_{50}
CG-1	249.8	—	533.3	—	8.9	—	NT
CG-2A	20.6	—	19.6	—	6.9	—	NT
CG-2B	136.9	—	140.4	—	13.1	—	NT
1	36.2 ± 5.1	2.8	46.9 ± 9.2	2.1	389.0 ± 10.9	0.2	103.1 ± 1.8
2	NA ^a	—	56.0 ± 2.1	2.3	68.7 ± 3.4	1.9	131.2 ± 3.2
3	NT		NT		NT		NT
4	NT		NT		NT		NT
5	67.7 ± 10.2	1.4	35.2 ± 3.2	2.8	54.5 ± 3.6	1.6	98.6 ± 1.2
6	15.5 ± 4.7	9.3	43.3 ± 4.2	3.3	174.6 ± 2.1	0.8	145.0 ± 2.9
7	43.9 ± 3.9	4.5	66.1 ± 7.2	3	179.5 ± 2.1	1.1	199.1 ± 2.7
8	69.3 ± 4.2	7.5	86.8 ± 11.3	6	102.7 ± 4.1	5	521.0 ± 6.3
9	120.5 ± 9.1	1	46.0 ± 2.1	2.6	65.7 ± 3.4	1.8	123.8 ± 4.2
Docetaxel	0.20 ± 0.01	5.5	0.23 ± 0.03	4.7	0.08 ± 0.01	13.7	1.1 ± 0.05

SI: Selectivity index were calculated as the ratio CC_{50} of VERO cells/ CC_{50} of each cell line

Table 5.6. Inhibition of the growth [IG_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] in HeLa, KB, HeP-2 and VERO cells of pure compounds isolated from *C. greggii*

Extract/ Compound	ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY			
	HeLa	KB	HeP-2	VERO
1	192.3 $\pm$ 2.4	45.0 $\pm$ 4.5	70.2 $\pm$ 4.5	146.8 $\pm$ 6.7
2	141.9 $\pm$ 1.6	55.4 $\pm$ 5.6	53.6 $\pm$ 5.6	189.7 $\pm$ 5.2
5	48.8 $\pm$ 3.1	33.8 $\pm$ 3.1	89.8 $\pm$ 4.9	89.2 $\pm$ 2.1
6	107.7 $\pm$ 1.2	46.0 $\pm$ 4.5	152.4 $\pm$ 3.2	221.5 $\pm$ 5.6
7	125.4 $\pm$ 2.3	58.9 $\pm$ 3.4	140.0 $\pm$ 2.5	201.4 $\pm$ 3.8
8	73.9 $\pm$ 2.9	66.6 $\pm$ 7.8	98.4 $\pm$ 2.8	351.0 $\pm$ 8.9
9	55.9 $\pm$ 2.5	19.22 $\pm$ 2.3	44.7 $\pm$ 5.6	143.5 $\pm$ 6.2
Docetaxel	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02

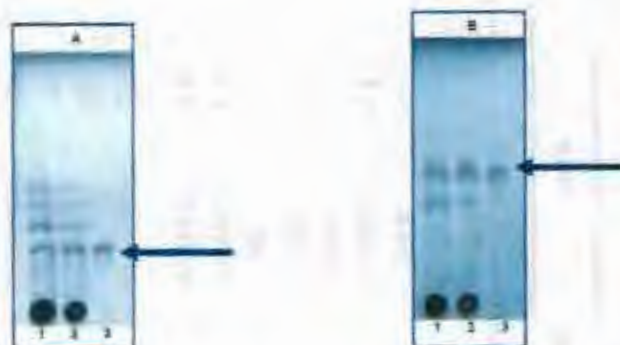


Figure 5.3. TLC analyses of 3-O-acetyl ceanothic acid in the crude extract of root from *C. greggii*. 1) Crude extract of root from *C. greggii*; 2) Co-chromatography of crude extract and 3-O-acetyl ceanothic acid; 3) 3-O-acetyl ceanothic acid; A) Hexane/ Me_2CO 8:2; B) Ether/Hexane 1:1.

5.2.7 References

- Baker, D.D., Chun, M., Oza, U. and V. Rajgarhia (2007). *The value of natural products to future pharmaceutical discovery*. Nat. Prod. Rep., 24, 1225-1244.
- Baxter, R.L. and D. Walkinshaw (1988). *Isolation and structure of an A-ring contracted triterpenoid from Colubrina texensis tissue culture*. Phytochemistry, 27, 2350-2352.
- Butler, M.S. (2008). *Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials*. Nat. Prod. Rep., 25, 475-516.
- Chan-Bacab, M.J. and L.M. Peña-Rodríguez (2001). *Plant natural products with leishmanicidal activity*. Nat. Prod. Rep., 18, 674-688.
- Chataing, B., Concepción, J.L., Lobaton, R. and A. Usubillaga (1998). *Inhibition of Trypanosoma cruzi growth in vitro by Solanum alkaloids: a comparison with ketoconazole*. Planta Med., 64, 31-33.
- De Mayo, P. and A.N. Starratt (1962). *Terpenoids II. Ceanothenic acid: A C₂₉ A-norlupan derivative*. Can. J. Chem., 40, 1632-1641.
- Duker-Eshun, G., Jaroszewski, J.W. and W.A. Asomaning (2004). *Antiplasmodial constituents of Cajanus cajan*. Phytotherapy Res., 18, 128-133.
- Eade, R.A., Ellis, J., Harper, P. and J.J.H. Simes (1973). *Extractives of australian timbers. XIII. Jinguillic acid, a triterpene of a lupane series containing a C28→19 lactone group*. Aust. J. Chem., 26, 831-837.
- Elsöhly, H.N., Danner, S., Li, X.C., Nimrod, A.C. and A.M. Clark (1999). *New antimycobacterial saponin from Colubrina refusa*. J. Nat. Prod., 62, 1341-1342.
- Fabricant, D.S. and N.R. Farnsworth (2001). *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. Env. Health Persp., 109, 69-75.
- García-Sosa, K., Villarreal-Alvarez, N., Lübken, P. and L.M. Peña-Rodríguez (2006). *Chrysophanol an antimicrobial anthraquinone from the root extract of Colubrina greggii*. J. Mex. Chem. Soc., 50, 76-78.

- Getti, G., Durgadoss, P., Dominguez-Carmona, D., Quintal-Martin, Z., Peraza-Sanchez, S., Peña-Rodriguez, L.M. and D., Humber 2009. *Leishmanicidal activity of Yucatecan medicinal plants on Leishmania species responsible for cutaneous leishmaniasis*. J. Parasitol. 95, 456-460.
- Giacomelli, S.R., Maldener, G., Stücker, C., Marasclulo, C., Schmidt, J., Wessjohann, L., Dalcol, I.I. and A.F. Morel (2007). *Triterpenoids from Gouania ulmifolia*. Planta Med., 73, 488-501.
- Gournelis, D.C., Laskaris, G.G. and R. Verpoorte (1998). "Cyclopeptide alkaloids" in: Herz, W., Falk, H., Kirby, G.W., Moore, R.E., Tamm, Ch. (Eds), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag Wien New York, pp. 83.
- Guinaudeau, H., Seligmann, O., Wagner, H. and A. Neszmely (1981). *Faralatoside and faratroside, two flavonol triglycosides from Colubrina faralatra*. Phytochemistry, 20, 1113-1116.
- Inchausti, A., Yaluff, G., Arias, A.R., Torres, S., Ferreira, M.E., Nakayama, H., Schinini, A., Lorenzen, K., Anke, T. and A. Fournet (1997). *Leishmanicidal and tripanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes*. Phytother. Res., 11, 193-197.
- Isset, J.-R. (2008). *Natural Products for Neglected Diseases: A Review*. Curr. Org. Chem., 12, 643-666.
- Johnston, M.C. (1971). *Revision of Colubrina (Rhamnaceae)*. Brittonia, 23, 2-53.
- Julian, P.L., Pikel, J., Dawson, R., 1938. The constituents of *Ceanothus americanus*. I. Ceanothic acid. J. Am. Chem. Soc. 60, 77-79.
- Kubo, I., Murai, Y., Soediro, I., Soetarno, S. and S. Sastrorihardjo (1992). *Cytotoxic anthraquinones from Rheum pulmatum*. Phytochemistry, 31, 1063-1065.
- Lee, S.M., Min, B.S., Lee, C.G., Kim, K.S. and Y.H. Kho (2003). *Cytotoxic triterpenoids from the fruits of Zizyphus jujuba*. Planta Med., 69, 1051-1054.

- Lee, S.-S., Chen, W.-C., Huang, C.-F. and Y. Su (1998). *Preparation and cytotoxic effect of ceanothic acid derivatives*. J. Nat. Prod., 61, 1343-1347.
- Lee, S.-S., Lin, B.F. and K.C.S. Liu (1996). *Three triterpene esters from Zizyphus jujuba*. Phytochemistry, 43, 847-851.
- Lee, S.-S., Shy, S.N. and K.C.S. Liu (1997). *Triterpenes from Pallurus hemsleyanus*. Phytochemistry, 46, 549-554.
- Lee, S.-S., Su, W.-C. and K.C. Liu (1991). *Two new triterpene glucosides from Pallurus ramosissimus*. J. Nat. Prod., 54, 615-618.
- Li, X.C., Cai, L. and C.D. Wu (1997). *Antimicrobial compounds from Ceanothus americanus against oral pathogens*. Phytochemistry, 46, 97-102.
- Mahato, S.B. and A.P. Kundu (1994). *¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features*. Phytochemistry, 37, 1517-1575.
- Mendieta, R. M. y S. Del Almo (1981). *Plantas Medicinales del Estado de Yucatán*, 1ª Ed. Compañía Editorial Continental, p 110.
- Muñoz, V., Moretti, C., Sauvain, M., Caron, C., Porzel, A., Massiot, G., Richard, B. and L. Le Men-Olivier (1994). *Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from Psychotria van heurkii (Syn. Tabernamontana van heurkii)*. Planta Med., 60, 455-459.
- Newman, D.J. and G.M. Cragg (2007). *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. J. Nat. Prod., 70, 461-477.
- Oulad-Ali, A., Guillaume, D., Weniger, B., Jiang, Y. and R. Anton (1994). *Mabiosides C-E: triterpenoid saponins from the bark of Colubrina elliptica*. Phytochemistry, 36, 445-448.
- Popoca, J., Aguilar, A., Alonso, D. and M.L. Villarreal (1998). *Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in mexican traditional medicine*. J. Ethnopharmacol., 59, 173-177.

- Rahman, A., Choudhary, M.I. and W.J. Thomsen (2001). "Bioassay techniques for drug development" in *Manual of bioassay techniques for natural products research*; Harwood Academic Publishers: Netherlands, pp. 34-35.
- Richardson, J.E., Fay, M.F., Cronk, Q.C.B., Bowman, D. and M.W. Chase (2000). *A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using RBCL and TRNL-F plastid DNA sequences*. Am. J. Bot., 87, 1309-1324.
- Roitman, J.N. and L. Jurd (1978). *Triterpenoid and phenolic constituents of Colubrina granulosa*. Phytochemistry, 17, 491-494.
- Suksamrarn, S., Panseeta, P., Kunchanawatta, S., Distaporn, T., Ruktasing, S. and A. Suksamrarn (2006). *Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from Ziziphus cambodiana*. Chem. Pharm. Bull., 54, 535-537.
- Saxena, S., Pant, N., Jain, D.C. and R.S. Bhakuni (2003). *Antimalarial agents from plant sources*. Curr. Sci., 85, 1314-1329.
- Sepúlveda-Boza, S. and B.K. Cassels (1996). *Plant metabolites active against Trypanosoma cruzi*. Planta Med., 62, 98-105.
- Trager, W. and J.B. Jensen (1976). *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 193, 673-675.
- Vera-Kú, B.M. (2004). *Evaluación de la actividad biológica en plantas medicinales nativas de la Península de Yucatán*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Wani, M.C., Taylor, H.L. and M.E. Wall (1973a). *Plant antitumour agents: Colubrinol acetate and colubrinol, antileukaemic ansa macrolides from Colubrina texensis*. J.C.S. Chem. Comm., 390.
- Wani, M.C., Taylor, H.L. and M.E. Wall (1973b). *Plant Antitumour Agents. XII. Texensine, A New Peptide Alkaloid from Colubrina texensis*. Tet. Lett., 4675.
- World Health Organization (2004). *The global burden disease: 2004 update*. WHO Library Cataloguing-in-publication data. p 10, 54.

- Xing-Gong, L., ElSohly, H.N., Nimrod, A.C. and M.A. Clark (1999). *Antifungal jujubogenin saponins from Colubrina retusa*. J. Nat. Prod., 62, 674-677.
- Ziegler, H.L., Franzyk, H., Sairafianpour, M., Tabatabai, M., Tehrani, M.D., Bagherzadeh, K., Hägerstrand, H., Stærk, D. and J.W. Jaroszewski (2004). *Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues*. Bioorg. Med. Chem., 12, 119-127.

5.3. PRINCIPALES CARÁCTERÍSTICAS EN LOS ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DEL ÁCIDO 3-O-ACETILCEANÓTICO.

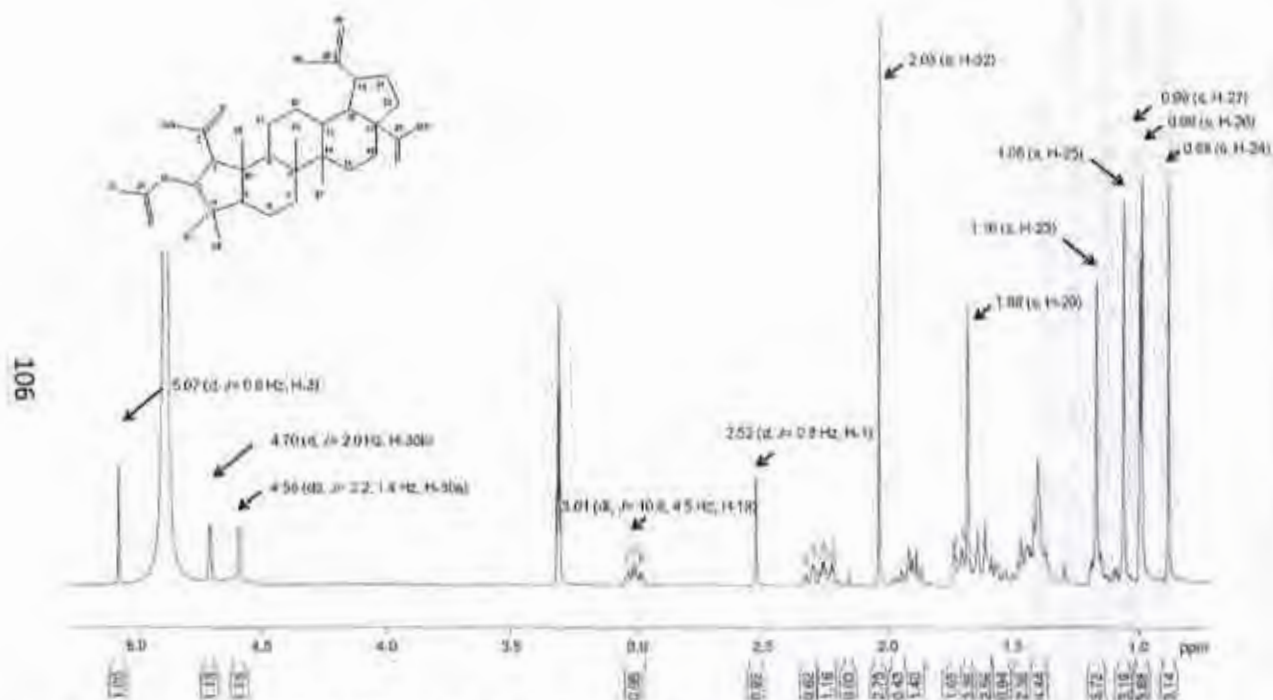


Figura 5.4. Espectro de ^1H -RMN del ácido 3-O-acetilceanoico

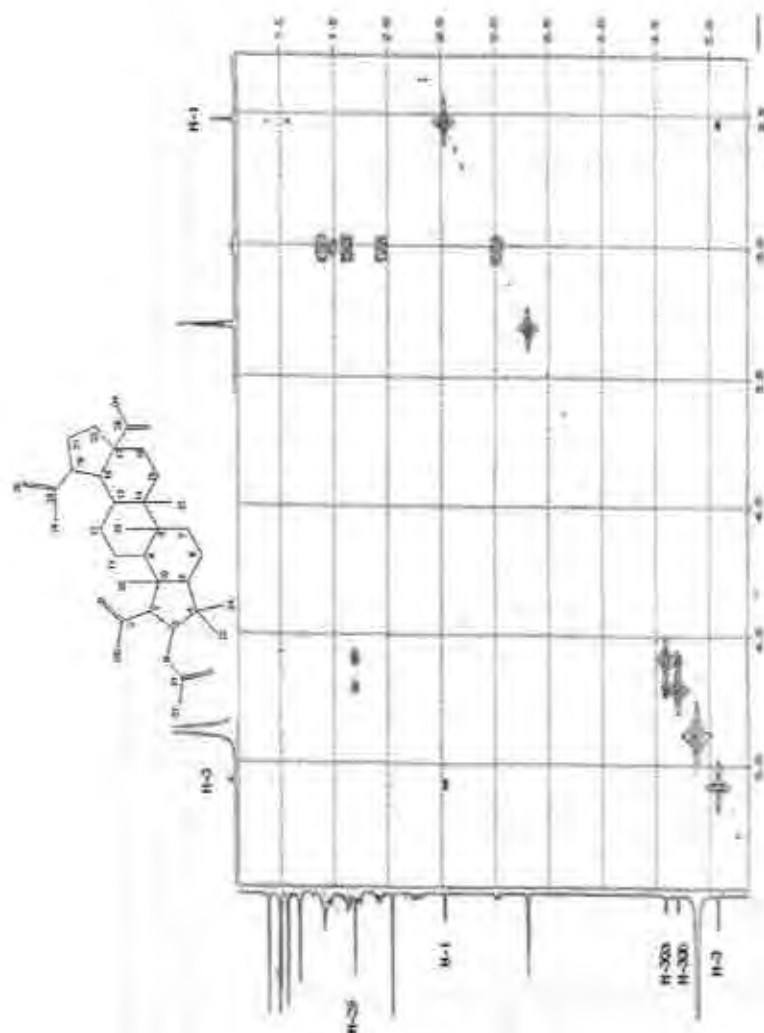


Figura 5.5. Ampliación del experimento H-H COSY del ácido 3-O-acetilcanónico

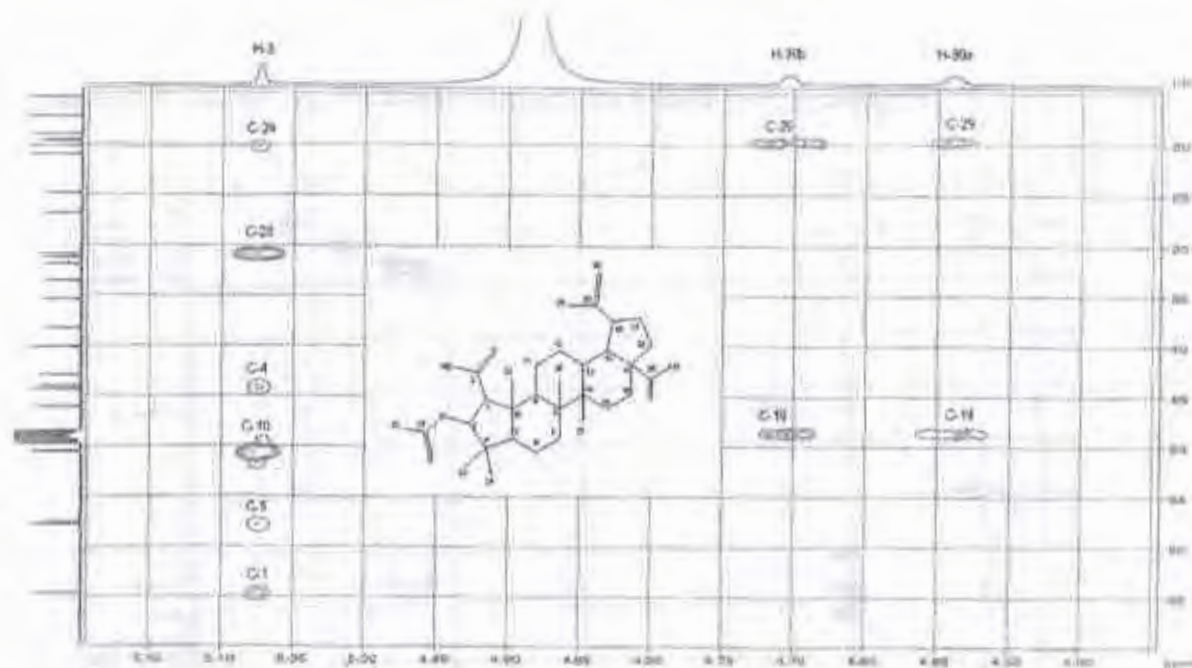


Figura 5.6. Ampliación del experimento HMBC del acetato del ácido 3-O-acetilceanoítico. El espectro muestra las principales correlaciones de H-3 que permitió el establecimiento de un anillo A con cinco miembros, característico de los ceanotanos.

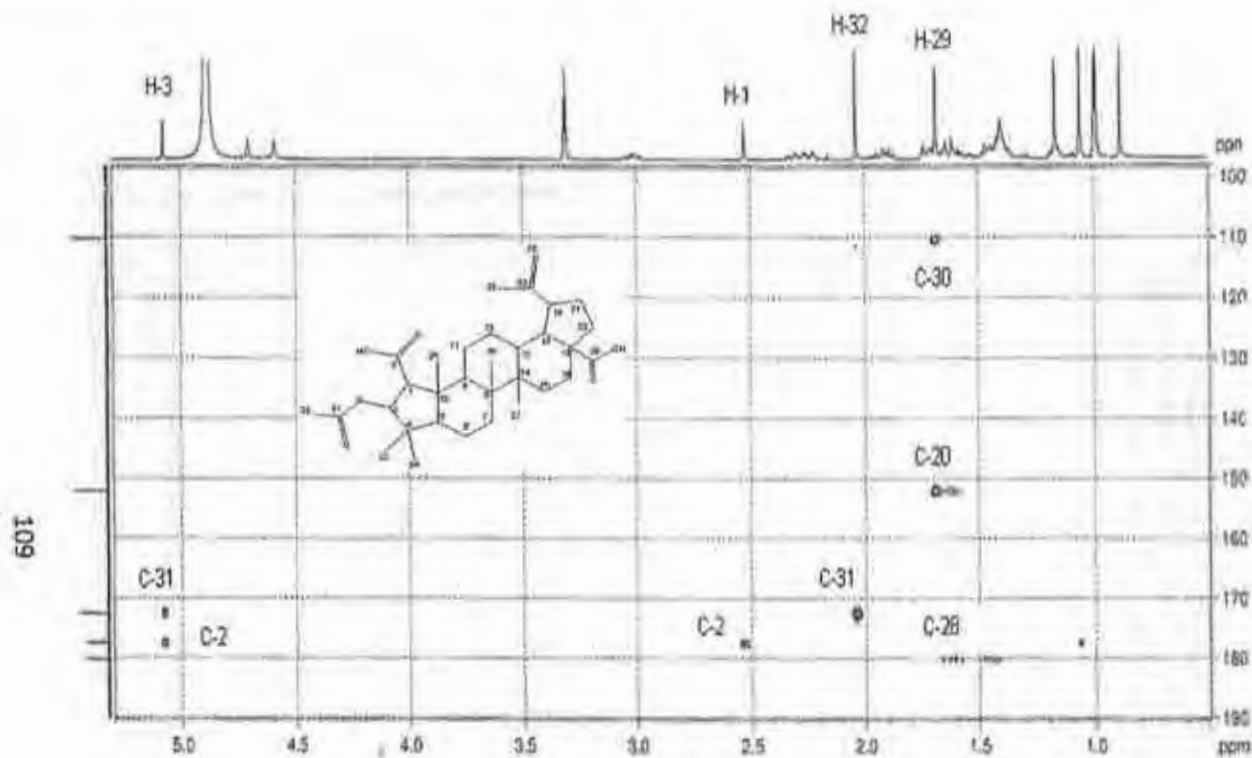


Figura 5.7. Ampliación del experimento HMBC del ácido 3-O-acetilcantharico. El espectro muestra las principales correlaciones de los carbonos a campo bajo.



Figura 5.8. Espectro de ^1H -RMN de la discarina B

CAPÍTULO 6

Pentalinon andrieuxii como fuente de metabolitos antagonistas en la asociación CXCL12/CXCR4

6.1 INTRODUCCIÓN

Los receptores a quimiocinas, pertenecen a la familia de proteínas transmembranales de siete dominios, acopladas a proteínas G (GPCRs) (Fredriksson *et al.*, 2005). Estos receptores son regulados por pequeñas proteínas quimioatrayentes, tipo citocina, denominadas quimiocinas. Actualmente se conocen 40 quimiocinas (Ribeiro *et al.*, 2007) y 19 receptores a quimiocina en humanos (Proudfoot *et al.*, 2010).

La unión de las quimiocinas a sus receptores inicia una cascada de eventos intracelulares que culminan con la expresión de efectos biológicos como la activación de la migración y la proliferación celular (Murdoch, 2000).

La mayoría de los receptores de quimiocina presentan una redundancia en su activación, e.g. el receptor CCR5 al que se le pueden unir nueve quimiocinas agonistas y una antagonista (Cocchi *et al.*, 1995; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 2006); sin embargo, existen otros receptores cuya activación es específica para una quimiocina en particular, e.g. el receptor CXCR4 que únicamente es activado por la quimiocina CXCL12 (Oberlin *et al.*, 1996; Lataillade *et al.*, 2004).

La expresión de CXCR4 es constitutiva en la mayoría de los tejidos y órganos; este receptor, junto con la quimiocina CXCL12, desempeña un papel esencial y no redundante en la organogénesis (corazón, sistema vascular, gónadas, cerebro) y en la maduración del sistema linfático durante el desarrollo embrionario (Lataillade *et al.*, 2004).

El receptor CXCR4 participa en varios procesos patológicos, e.g. es el único receptor a quimiocina que se conoce en el que una anomalía en el gen que lo codifica produce la patología humana conocida como el síndrome de WHIM (Balabanian *et al.*, 2005). Asimismo, CXCR4 actúa como un co-receptor para la entrada de los virus VIH-1 T-trópicos (X4) a las células CD4⁺ (Berger *et al.*, 1999). El receptor CXCR4 también juega un papel importante en la respuesta inflamatoria (Murdoch, 2000) y en el proceso de metástasis de cáncer (Balkwill, 2004; Slagsvold *et al.*, 2006).

Con base a lo anterior, la interacción CXCL12/CXCR4 se considera como un importante blanco en la búsqueda de nuevos y más eficientes tratamientos para estos padecimientos (Liles *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2006; Tamamura *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2007; Hachet-Haas *et al.*, 2008).

Aun cuando los GPCRs son considerados como uno de los principales blancos terapéuticos por la industria farmacéutica, hasta ahora solo existe un producto comercializado en el campo de los fármacos contra quimiocinas; este producto, conocido como maraviroc, es un bloqueador del co-receptor CCR5. Por otra parte, recientemente se aprobó Plerixafor (Mozobil, AMD3100), un fármaco que actúa sobre el receptor CXCR4, y produce la movilización de células hematopoyéticas; finalmente, a la fecha hay 32 moléculas de baja masa molecular que actúan contra los receptores de quimiocina en fase clínica. De estas últimas moléculas, tres actúan contra el receptor CXCR4 y diez contra el receptor CCR5 (Proudfoot *et al.*, 2010).

Hasta ahora, los métodos para la detección de las interacciones de los receptores con sus ligandos han requerido del empleo de ligandos marcados con radioisótopos (e.g. ^3H , ^{125}I , ^{32}P); sin embargo, esta técnica presenta varias desventajas, incluyendo riesgos a la salud, la necesidad de eliminar los residuos radiactivos, y el requerimiento de licencias especiales para el manejo de los radioisótopos. Por lo anterior, durante los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas de detección basados en colorimetría, luminiscencia o fluorescencia (de Jong *et al.*, 2005). En el laboratorio del Dr. Jean-Luc Galzi, en el Instituto de la Escuela de Biotecnología de Estrasburgo, se desarrollaron receptores y ligandos fluorescentes que permiten medir en tiempo real la unión de un ligando a un receptor empleando la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET) (Volmer *et al.*, 1999), una técnica empleada en varios GPCRs incluyendo los receptores a quimiocina (Franchet *et al.*, 2006; Galzi *et al.*, 2006).

El principio del FRET, aplicado al receptor a quimiocina CXCR4, demostró que la quimiocina CXCL12, marcada con el fluoróforo Texas red (TR), se une al receptor CXCR4 marcado con la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP-CXCR4), produciendo las correspondientes cinéticas de asociación en tiempo real y que, adicionalmente, CXCL12-TR es capaz de inducir la internalización, tanto del receptor marcado (EGFP-CXCR4) como del no marcado (CXCR4) (Valenzuela-Fernández *et al.*, 2001).

Recientemente y con base en lo anterior, la asociación CXCL12-TR/EGFP-CXCR4 ha sido utilizada en la búsqueda de moléculas con potencial aplicación farmacológica que interaccionan con el eje CXCL12/CXCR4 (Hachet-Haas *et al.*, 2008).

Dado que, hasta ahora, el único estudio de plantas como fuentes de moléculas antagonistas al eje de activación celular CXCL12/CXCR4 reporta el empleo de radioligandos (Chen *et al.*, 2003), en este capítulo se muestran los resultados de la evaluación del extracto crudo y fracciones de purificación de *Pentstemon andrieuxii*, empleando el ensayo de la inhibición de la unión de CXCL12-TR/EGFP-CXCR4 y los ensayos de la internalización del receptor EGFP-CXCR4 inducido por CXCL12, inhibición de la producción del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y del efecto sobre la movilización de calcio intracelular por activación de los receptores a quimiocina CXCR4, CCR5 y receptores muscarínicos M₃.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Procedimientos generales

La digitonina, el AMD3100, el carbachol, el ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich), la penicilina, la estreptomycin, la L-glutamina, el medio mínimo esencial (MEM), el suero fetal bovino complementado (FBS) (Invitrogen), el péptido T134 (Genecust), así como la quimiocina CCL5 (DB Biosciences) y el anticuerpo anti-ratón Ig-G (H+L)-PE (Beckman Coulter) obtenido de cabra, fueron adquiridos de diferentes distribuidores comerciales. Las quimiocinas CXCL12 y CXCL12-Texas Red fueron sintetizadas de acuerdo a lo reportado por Amara *et al.* (1999) y Valenzuela-Fernández *et al.* (2001).

6.2.2 Purificación del extracto crudo de *P. andrieuxii*

La colecta de *P. andrieuxii* y la obtención del extracto orgánico crudo (PA-1) se realizó de acuerdo a lo reportado en las secciones 4.3.3.1 y 4.3.3.2. Una porción (10 g) del extracto orgánico crudo (PA-1) se extrajo sucesivamente con hexano (350 mL) y acetato de etilo (350 mL) durante tres horas en un sonicador (Cole-Parmer modelo 8853). Después de evaporar los diferentes disolventes se obtuvieron las correspondientes fracciones de baja (PA-3A, 12.2 g, 24.5%), media (PA-3B, 5.15 g, 10.3%) y alta polaridad (residuo, PA-3C, 32.6 g, 65.2%). La fracción PA-3C (32 g) fue purificada por cromatografía en columna líquida al vacío, utilizando una

columna de 6.5 cm de diámetro y 5 cm de altura y una elución con mezclas de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (14:7:1 y 10:10:1). Se colectaron fracciones de 200 mL y se realizaron lavados con 400 mL de acetona y metanol. Las fracciones se monitorearon por *cod* y se combinaron en 13 fracciones principales (PA-4A-4M). La fracción PA-4K (190 mg) fue purificada por HPLC utilizando una columna semipreparativa Phenomenex C18 (Luna 250 x 10mm x 5µ) y una mezcla isocrática de agua (80%) y metanol (20%) acidificados con 0.1% de TFA como eluyente. El flujo del eluyente se mantuvo a 3 mL·min⁻¹ y la detección de los componentes se realizó a 240 y 280 nm. De esta purificación se obtuvieron 10 fracciones principales (PA-5A-5J), de las cuales las fracciones PA-5C (3.2 mg, 1.7%) y PA-5D (1.4 mg, 0.7%) mostraron la mayor actividad en el ensayo de movilización del calcio intracelular inducido por CXCL12. La fracción PA-5D mostró un solo componente por HPLC.

6.2.3 Ensayos sobre receptores

Estos ensayos se realizaron en los Laboratorios de Biomoléculas e Innovaciones Terapéuticas de la Facultad de Farmacia y Escuela Superior de Biotecnología de Estrasburgo (ESBS), Francia. Las mediciones se realizaron en tres experimentos independientes y los análisis fueron realizados utilizando el software Kaleidagraph 4.03 (Synergy Software, Reading, PA) y GraphPad 4.0, (Software Inc., San Diego, CA).

6.2.3.1 Unión de CXCL12-TexasRed/EGFP-CXCR4 en tiempo real

El método se basa en el procedimiento reportado por Valenzuela-Fernández *et al.* (2001). Las células HEK-293 (células de riñón de embriones humanos), transfectadas establemente con el receptor CXCR4 marcado con la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP-CXCR4), se cultivaron a 37 °C y 5% CO_2 en medio MEM, suplementado con 10% de FBS, con una mezcla de penicilina (100 U·mL⁻¹), estreptomycin (100 µg·mL⁻¹), L-glutamina (2 mM) e higromicina B como agente de selección. Los cultivos con un 80% de crecimiento fueron disgregados con PBS-EDTA (amortiguador salino de fosfatos con 5mM de EDTA); las células fueron lavadas con medio de cultivo, centrifugadas y resuspendidas en 8 mL de hepes/BSA (137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 , 6 mM KCl, 5.6 mM glucosa, 10 mM hepes, 0.4 mM NaH_2PO_4 y 0.1% m/v albúmina sérica bovina) con 1% (v/v) de inhibidores de proteasas (bestatina y bacitracina, 4 mg·mL⁻¹; fosforamidón, 2 mg·mL⁻¹; quimostatina, 10 mg·mL⁻¹; leupeptina, 1 mg·mL⁻¹). La medición de la unión entre el receptor EGFP-CXCR4, expresado por las células HEK-293, y la quimiocina CXCL12-TR

agregada a la suspensión celular se realizó en un experimento "time based scan" utilizando un espectrómetro SPEX Fluorolog-2 (Jobin-Yvon) y 1 mL de una suspensión celular (1×10^6 células $\cdot$ mL $^{-1}$), que fueron mantenidas a 21 °C en una celda de cuarzo con un agitador magnético. Para evaluar la interacción receptor-ligando se excitó la suspensión celular a la longitud de onda de excitación de la EGFP (470 nm) y se midió la reducción de la emisión (a 510 nm) en un tiempo total de experimentación de 300 s. Para el monitoreo de actividad en el ensayo de inhibición de la unión de CXCL12-TR/EGFP-CXCR4, los extractos o fracciones fueron evaluados a una concentración final de 40 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ y las curvas dosis-respuesta se realizaron empleando concentraciones entre 0.1 y 100 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$. Como testigo positivo (bloqueo de la unión de la quimiocina CXCL12-TR) se utilizó T134 (100 nM). Las mediciones se realizaron en tres experimentos independientes y en las gráficas se muestra el error estándar. Los cálculos se realizaron a partir de datos normalizados utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la unión (\%)} = 100 \cdot \frac{\Delta_{\text{Fracción}} - 100}{\Delta_{\text{Testigo}}}$$

$\Delta_{\text{Fracción o Testigo}}$ = Valor estable al adicionar la fracción o DMSO – Valor estable en el máximo de acción al adicionar CXCL12-TR.

6.2.3.2 Ensayos de internalización del receptor EGFP-CXCR4

6.2.3.2.1 Visualización de la internalización del receptor EGFP-CXCR4 por microscopía

Las células HEK-293, transfectadas establemente con EGFP-CXCR4, se cultivaron en placas de 24 pozos que contenían cubreobjetos redondos de 12 mm previamente tratados con colágeno de rata (Roche, 60 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$) y se mantuvieron a 37 °C en medio MEM suplementado como se describió en la sección 6.2.3.1. A las placas con un 80% de crecimiento celular se les cambió el medio por hepes-BSA y se preincubaron por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente los cultivos celulares fueron tratados con las muestras **PA-1**, **PA-3A**, **PA-3B**, **PA-3C**, **PA-4K**, disueltas a una concentración final de 40 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ en hepes-BSA, además de T134 1 μ M (testigo positivo) y hepes-BSA (testigo negativo, en ausencia y presencia de CXCL12 (100 nM) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Las placas fueron colocadas en hielo para detener el metabolismo celular y se les adicionó PBS para lavar las células; posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% (Euromedex) por 15 minutos a

temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron retirados, lavados y fijados en portaobjetos con mowiol (Calbiochem®) y las láminas fueron observadas en un microscopio Zeiss Axioplan (Zeiss, Alemania), con un objetivo 40x con aceite de inmersión y un juego de filtros que permiten observar la EGFP. Finalmente las imágenes fueron capturadas con una cámara Olympus DP50 (Olympus, Optical, Japan).

6.2.3.2.2 Cuantificación de la internalización del receptor EGPF-CXCR4 empleando anticuerpos

Estos experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Gicquiaux *et al.* (2002) y Hachet-Haas *et al.* (2008). Los cultivos con un 80% de crecimiento fueron disgregados con PBS-5 mM EDTA, centrifugados, resuspendidos en hepes-BSA (3.2×10^5 células·200 μL^{-1}) y mantenidos a 37 °C por 15 min. Las fracciones **PA-3C** y **PA-4K** se evaluaron a una concentración final de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con CXCL12 (100 nM) y se adicionaron a la suspensión celular para iniciar la cinética a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 200 μL de cada suspensión a 0, 15 y 30 min, que se adicionaron a una placa de 96 pozos de fondo cónico con azida de sodio (Sigma) fría a una concentración final de 0.1% (v/v) para detener el metabolismo celular. Las células en placas se incubaron por 15 min con PBS-BSA 1% para evitar el marcaje no específico de los anticuerpos a las células. El marcaje primario se realizó para los receptores que se encuentran únicamente en la superficie celular, por lo que las células fueron incubadas durante 60 min con el anticuerpo monoclonal (anti-hCXCR4 IgG_{2A} de ratón, en una proporción 1:100 en PBS-BSA 1%). Posteriormente las células fueron lavadas y el segundo marcaje se realizó incubando las placas durante 60 min con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con ficoeritrina; 1:100 en PBS-BSA 1%). Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y se mantuvieron en PBS y refrigeración hasta su lectura. La lectura de la fluorescencia de la ficoeritrina se realizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Bioscience). Se colectaron datos de 10,000 células con el programa CellQuest Pro (BD Bioscience). La fluorescencia media de ficoeritrina fue calculada para cada muestra, eliminando la fluorescencia producida por el marcaje no específico del anticuerpo secundario en las células. Los resultados fueron expresados como porcentaje de receptor mantenido en la superficie celular al minuto 30, estableciendo el 100% como la fluorescencia de las células incubadas en ausencia de la quimioquina agonista CXCL12. Los análisis estadísticos para determinar la existencia de diferencias significativas entre las diferentes fracciones (**PA-3C**, **PA-4G** y **PA-4K**) y el testigo negativo (células en

presencia de CXCL12 únicamente) se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la comparación de medias se realizó mediante una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

6.2.3.3 Mediciones de segundos mensajeros

6.2.3.3.1 Movilización del calcio intracelular

La relación del calcio intracelular se realizó de acuerdo a lo reportado por Hachet-Haas *et al.* (2008), usando indo-1 AM (FluoProbes®) como marcador de calcio. Las células HEK-293 transfectadas con EGFP-CXCR4 o CCR5 fueron incubadas con indo-1 AM (5 μM) durante 45 minutos para permitir la entrada del marcador de calcio al citoplasma. Las respuestas de calcio fueron realizadas a 37 °C en una celda de cuarzo con agitación conteniendo una suspensión de 1×10^6 células·mL⁻¹. Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro en el modo "time based scan" ajustado a la excitación del Indo-1 (335 nm) y los cambios de fluorescencia del marcador indo-1 fueron medidos a 401 y 475 nm. La relación entre la intensidad a 401 nm y la intensidad a 475 nm fue calculada y normalizada de acuerdo con la intensidad máxima de fluorescencia detectada después la adición del detergente digitonina. Los resultados son presentados como cinéticas o curvas dosis-respuesta, en las que se tomaron los valores de la amplitud máxima de los diferentes tratamientos y se consideró como el 100% de la respuesta a la amplitud máxima de la respuesta de calcio cuando fue inducida por CXCL12.

6.2.3.3.2 Inhibición de la producción del adenosín monofosfato cíclico (AMPc)

Los experimentos de la producción de AMPc intracelular en células HEK-293 EGFP-CXCR4 fueron realizados por el Dr. Bernard Bucher de acuerdo con lo reportado por Gicquiaux *et al.* (2002). Las placas de 24 pozos, con células con un 80% de confluencia, fueron lavadas con PBS y posteriormente incubadas a 37 °C por 10 min con buffer de ensayo (150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2.5 mM de CaCl₂, 1.2 mM de KH₂PO₄, 1.2 mM de MgSO₄, 25 mM de NaHCO₃, 10 mM de hêpes, 10 mg·mL⁻¹ de BSA, pH 7.4). El buffer de ensayo fue remplazado por buffer con 0.5 mM de 3-isobutil-metil-xantina (IBMX) durante 10 min y las células fueron expuestas a 10 μM de forskolina para incrementar la producción de AMPc, se empleó un rango de concentraciones del agonista CXCL12 de 1×10^{-8} a 1×10^{-10} M y la fracción PA-4K (10 y 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ó T134 1 μM (testigo positivo) durante 20 min a 37 °C. La reacción fue detenida por adición de 0.2 M de HCl frío y las

células fueron lisadas por sonicación y centrifugadas durante 15 min; los sobrenadantes fueron almacenados a 20 °C hasta la determinación de AMPc por un radioinmunoensayo empleando anti-AMPc y AMPc marcado con ¹²⁵I.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto crudo de hojas de *P. andrieuxii* (**PA-1**) se evaluó en el ensayo de unión de la quimiocina CXCL12-TR al receptor EGFP-CXCR4, encontrándose una inhibición de ca. 10% de la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET). El extracto crudo **PA-1** fue fraccionado para obtener las correspondientes fracciones de baja (**PA-3A**), media (**PA-3B**) y alta (**PA-3C**) polaridad, que fueron evaluadas a una concentración final de 40 µg·mL⁻¹ en el ensayo de unión de CXCL12-TR al receptor EGFP-CXCR4. El péptido T134 (500 nM) se utilizó como testigo positivo, debido a que es un antagonista específico del receptor CXCR4 (Arakaki *et al.*, 1999) e inhibe casi totalmente la unión de CXCL12-TR al receptor CXCR4. Los resultados obtenidos mostraron que la fracción **PA-3C** produce la mayor inhibición de la unión CXCL12-TR/EGFP-CXCR4, con un 54.3% de inhibición del FRET.

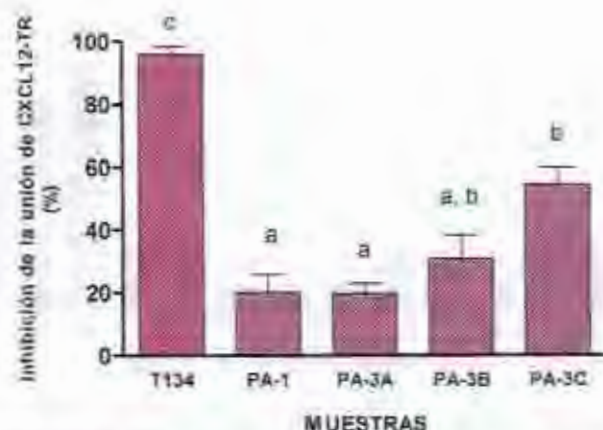


Figura 6.1. Porcentajes de inhibición de la unión de CXCL12-TR con el receptor EGFP-CXCR4 por efecto del extracto crudo y las fracciones semipurificadas de *P. aridireuxii*. El extracto orgánico crudo (PA-1) y las fracciones semipurificadas de baja (PA-3A), media (PA-3B) y alta (PA-3C) polaridad ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), así como el péptido T134 (500 nM) usado como testigo positivo, fueron adicionados al minuto 1 y al minuto 3 se adicionó CXCL12-TR. La determinación de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el extracto y las fracciones semipurificadas se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA); la comparación de medias se realizó mediante una prueba de Tukey (letras diferentes significan diferencias en los tratamientos). Las barras en los gráficos muestran el error estándar para tres experimentos independientes.

La purificación por cromatografía en columna líquida al vacío de la fracción de polaridad alta **PA-3C**, condujo a la obtención de las fracciones **PA-4A-4M** que al ser evaluadas en el ensayo de la inhibición de la unión de CXCL12-TR/EGFP-CXCR4, mostraron que la fracción **PA-4K** ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) presenta la mayor actividad con un 83.5% de inhibición de la unión de la quimiocina a su receptor (Figura 6.2). La evaluación de la fracción **PA-4K** a diferentes concentraciones mostró que la inhibición de la unión de CXCL12-TR a EGFP-CXCR4 causada por esta fracción es dependiente de la concentración, con una IC_{50} de $3.86 \pm 1.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 6.3).



Figura 6.2. Porcentaje de inhibición de la unión de la quimiocina CXCL12-TR con el receptor EGFP-CXCR4 por efecto de las fracciones PA-4A-4M. Las barras muestran el porcentaje de disminución del FRET de datos normalizados para 1×10^5 células HEK-293 EGFP-CXCR4 en presencia de CXCL12-TR (100 nM) y las diferentes fracciones a $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La determinación de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la fracción de polaridad alta (PA-3C) y sus fracciones de purificación, se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la comparación de medias se realizó mediante el método múltiple de Dunnett (**, $P < 0.01$). Las barras en los gráficos muestran el error estándar para tres experimentos independientes.

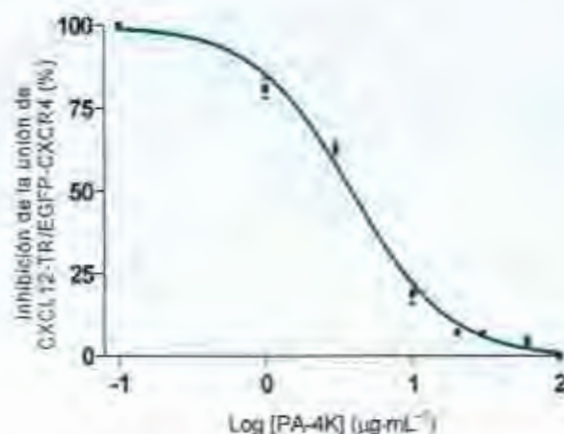


Figura 6.3. Porcentajes de Inhibición a diferentes concentraciones de la fracción **PA-4K** en la unión de la quimiocina CXCL12-TR con el receptor EGFP-CXCR4. Los puntos representan el porcentaje de disminución del FRET en presencia de la fracción **PA-4K** a diferentes concentraciones (entre 100 y 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); los datos fueron normalizados para 1×10^6 células HEK-293 EGFP-CXCR4 en presencia de CXCL12-TR (100 nM) y los gráficos muestran el error estándar para tres experimentos independientes.

El efecto inhibitorio producido por la fracción **PA-4K**, en la unión CXCL12-TR/EGFP-CXCR4, sugiere que la fracción **PA-4K** contiene componentes capaces de impedir de forma competitiva la unión del ligando natural CXCL12.

La unión de un ligando con un receptor puede modificar diferentes procesos de la transducción celular y producir una respuesta biológica; los ligandos que presentan esta característica son denominados agonistas y los ligandos que se unen al receptor pero no lo activan y que además bloquean la acción de los agonistas, se denominan antagonistas (Pazos *et al.*, 2004). Para determinar si un producto posee un efecto agonista o antagonista, es necesario realizar estudios sobre la respuesta celular (Figura 6.4), siendo una de las respuestas producidas por la activación del receptor CXCR4, la endocitosis del propio receptor.



Figura 6.4. Vía de transducción de señales inducida por la unión de CXCL12 al receptor CXCR4, relacionadas principalmente a la migración y la quimiotaxis; otros efectos incluyen la supervivencia, proliferación y transcripción celular. Los inhibidores de esta vía incluyen péptidos, moléculas de bajo peso molecular y anticuerpos que inhiben la unión del ligando al receptor. Tomado de Wong *et al.*, (2008).

La endocitosis de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) es una consecuencia de la respuesta celular y una protección ante la estimulación celular excesiva o prolongada por acción de sus agonistas. La activación de los GPCRs a su vez activa a las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), una familia de cinasas que se encargan de la fosforilación de la serina y treonina en los receptores cuando se encuentran asociados a sus agonistas. Esta fosforilación activa una cascada compleja de señales que permite a las arrestinas unirse a los receptores y actuar como un adaptador entre el receptor y la maquinaria endocítica dependiente de clatrina (Shenoy *et al.*, 2003). Lo anterior permite la formación de endosomas, en los que se internalizan los receptores CXCR4 y se disocian rápidamente de las arrestinas, ocurriendo una desfosforilación para poder ser reciclados hacia la membrana plasmática (desensibilización) o degradarse (regulación negativa) (Perry & Lefkowitz, 2002, Venkatesan *et al.*, 2003).

Para los experimentos de visualización de la internalización del receptor EGFP-CXCR4 en células HEK-293 realizados con el extracto orgánico crudo **PA-1** y las fracciones semipurificadas **PA-3A-3C** y **PA-4K** se utilizaron dos condiciones; una que permite establecer una respuesta de tipo agonista y otra que permite observar una respuesta antagonista. En la primera se debe observar la endocitosis del receptor por acción de las fracciones *per se*, en tanto que en la segunda el efecto antagonista se evidencia por la permanencia del receptor EGFP-CXCR4 en la superficie celular cuando las células se encuentran en presencia del agonista CXCL12 y de los diferentes tratamientos.

Los resultados de estos experimentos mostraron que, en ausencia de quimiocina CXCL12 y tratamiento (Figura 6.5a), el receptor EGFP-CXCR4 se ubica en la membrana plasmática de las células, dado que la fluorescencia de la EGFP es observada en la periferia celular. Por otra parte, la incubación de las células con CXCL12 (100 nM) (Figura 6.5b) mostró sitios fluorescentes correspondientes a los receptores en los endosomas. El tratamiento de los cultivos celulares con el péptido antagonista T134 (1 μ M) mostró que éste no modifica el patrón de localización de los receptores EGFP-CXCR4 (Figura 6.5c), en tanto que el tratamiento de las células con el péptido T134 (1 μ M) y la quimiocina CXCL12 (100 nM) (Figura 6.5d) mostró claramente el efecto antagonista del péptido, debido a que impide la internalización producida por CXCL12 y mantiene la fluorescencia en la periferia celular tal y como se observó en las células sin tratamiento (Figura 6.5a). Las evaluaciones del extracto orgánico crudo **PA-1** y las fracciones semipurificadas **PA-3A-3C** y **PA-4K**, en ausencia de la quimiocina CXCL12 (Figura 6.5e, g, i, k y m), mostraron que ninguna de las fracciones induce *per se* una internalización del receptor CXCR4. Sin embargo, al incubar las células con el extracto orgánico crudo y las fracciones semipurificadas en presencia del agonista CXCL12, se encontró que mientras las fracciones **PA-3A** y **PA-3B** no inhiben el efecto agonista de CXCL12, observándose la presencia del receptor EGFP-CXCR4 en vesículas endocíticas (Figura 6.5h y j), el extracto crudo **PA-1** y las fracciones **PA-3C** y **PA-4K** inhiben la internalización del receptor en las células, observándose la fluorescencia de la EGFP en la periferia de la membrana plasmática (Figura 6.5f, l y n). Estos resultados sugieren que el extracto de hojas de *P. andrieuxii* contiene metabolitos que actúan como inhibidores de la unión de CXCL12/CXCR4, pero que no contiene agonistas del receptor CXCR4, y que los metabolitos responsables de la actividad detectada en el extracto crudo **PA-1**, son de naturaleza polar.

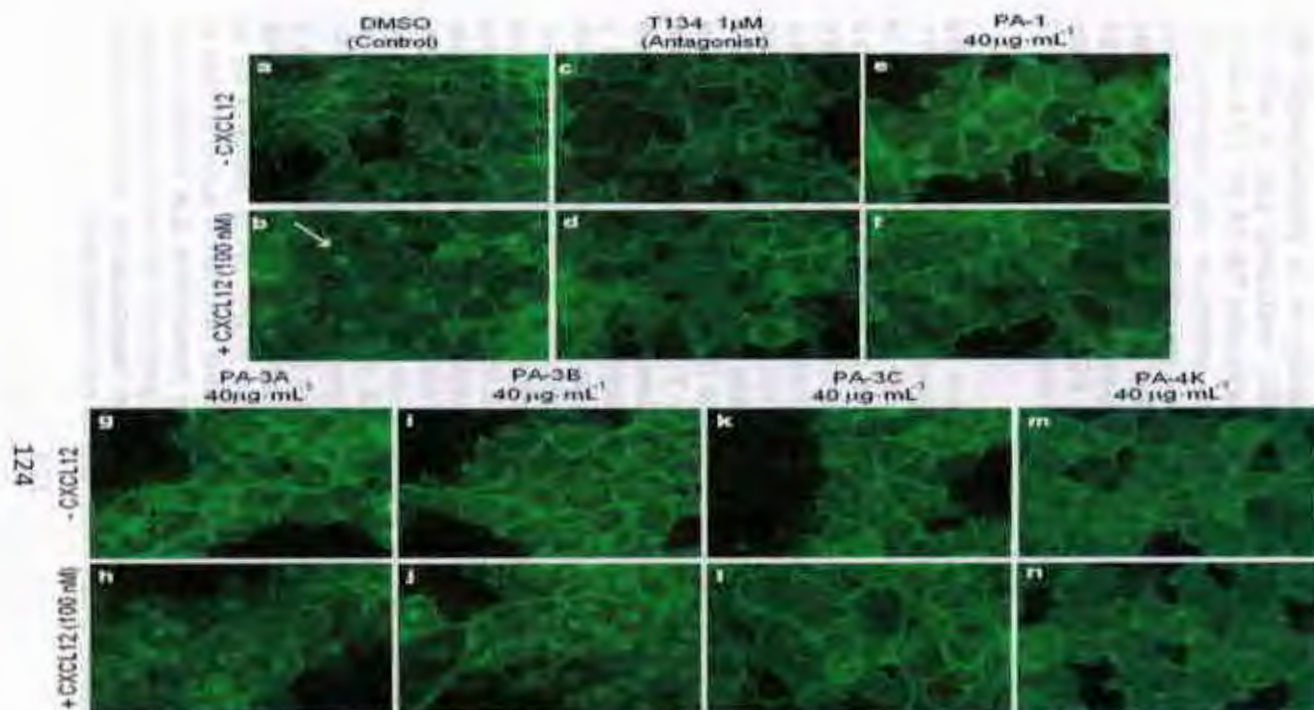


Figura 5.5. Observación por microscopía de fluorescencia del efecto del extracto crudo de *P. andrieuxii* (PA-1) y sus fracciones de purificación (PA-3A-3C, PA-4K) en la internalización del receptor EGFP-CXCR4 expresado en células HEK-293. Las imágenes muestran el efecto del antagonista T134 y las fracciones, en ausencia (-CXCL12, a, c, e, g, i, k y m) y presencia de 100 nM de CXCL12 (+CXCL12; b, d, f, h, j, l y n) a los 15 minutos de incubación. La flecha indica la internalización del receptor EGFP-CXCR4 en el endosoma de reciclamiento.

Dados los resultados obtenidos con las fracciones semipurificadas **PA-3C** y **PA-4K** en la evaluación por microscopía de la internalización del receptor EGFP-CXCR4, se realizó la cuantificación de la expresión del receptor en la superficie celular mediante un marcaje doble con anticuerpos. La expresión del receptor en la superficie celular se determinó usando la intensidad de la fluorescencia de la ficoeritrina del anticuerpo secundario, considerando la intensidad de la fluorescencia obtenida en células sin activación del receptor CXCR4 (sin tratamiento) como la máxima expresión del receptor EGFP-CXCR4. En presencia de la quimiocina CXCL12 (100 nM), las células presentaron un 60% de expresión del receptor en la membrana plasmática después de 30 minutos. Por otra parte, el antagonista AMD3100 (10 μ M), que mostró una expresión del receptor en la membrana plasmática de alrededor del 90% en presencia de la quimiocina CXCL12, fue utilizado como testigo positivo en sustitución del antagonista T134, dado que este último se une al mismo sitio que el anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 (Arakaki *et al.*, 1999). Finalmente, la evaluación de las fracciones **PA-3C**, **PA-4G** y **PA-4K**, en presencia de la quimiocina CXCL12, mostró que las fracciones **PA-3C** y **PA-4K** presentan un 80 y un 100%, respectivamente, de expresión del receptor EGFP-CXCR4 en la membrana plasmática celular (Figura 6.6), en tanto que la fracción **PA-4G**, inactiva en el ensayo de inhibición de la unión de CXCL12-TR/EGFP-CXCR4 (Figura 6.2), no modificó el porcentaje de expresión del receptor. Estos resultados confirman que las fracciones **PA-3C** y **PA-4K** impiden la internalización del receptor EGFP-CXCR4 en la presencia de CXCL12.

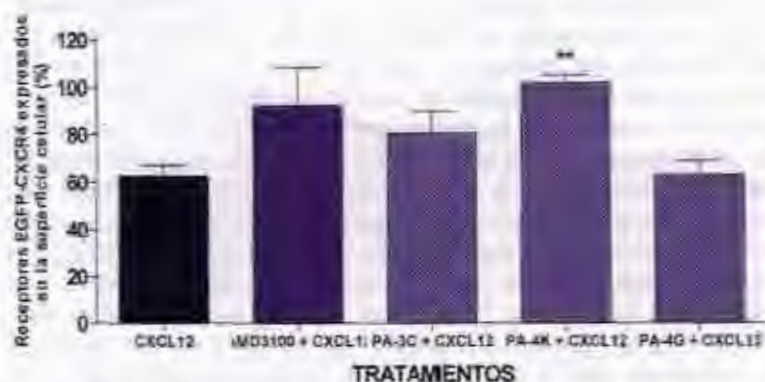


Figura 6.6. Cuantificación porcentual de receptores EGFP-CXCR4 presentes en la membrana plasmática en presencia de las fracciones semipurificadas de *P. andrieuxii* (PA-3C, PA-4K y PA-4G). Los porcentajes de receptores en la superficie de las células fueron tomados al minuto 30 de incubación de la quimiocina CXCL12 (100 nM), en presencia o ausencia de los diferentes tratamientos (PA-3C, PA-4K, PA-4G a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), y el antagonista AMD3100 (10 μM) como testigo positivo. La determinación de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el efecto de CXCL12 solo y con los diferentes tratamientos, se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA); la comparación de medias se realizó mediante una prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los gráficos muestran las medias con el error estándar para dos experimentos independientes.

Se ha reportado que la unión de la quimiocina CXCL12 al receptor CXCR4 induce cambios conformacionales en el receptor, que permiten el acoplamiento de una proteína G inhibitoria (G_i) que posteriormente se disocia en una subunidad α unida a GTP y en el complejo $\beta\gamma$. Los productos de esta disociación regulan enzimas efectoras: la subunidad α es de tipo inhibitorio (α_i) y regula de manera negativa a la enzima adenilato ciclasa (AC), encargada de la producción de AMPc a partir del ATP, reduciendo así la formación del AMPc (Coleman *et al.*, 1994; Busillo *et al.*, 2007), y el complejo $\beta\gamma$ actúa sobre la fosfolipasa C ($\text{PLC}\beta$), que conduce a la producción de inositol trifosfato (IP_3) y, por acción de éste, a la movilización del calcio intracelular que culmina con la migración celular (Busillo *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2008; Figura 6.4). Tomando en cuenta la importante actividad inhibitoria de la unión de CXCL12 al receptor CXCR4 mostrada por la fracción **PA-4K**, se evaluó la capacidad de esta fracción para inhibir la activación de proteínas G_i midiendo, inicialmente, la movilización del calcio intracelular inducida por CXCL12 en las células HEK-293 EGFP-CXCR4. Los resultados obtenidos mostraron que la fracción **PA-4K** reduce la

amplitud de la respuesta máxima de calcio cuando las células se encuentran en presencia del agonista CXCL12, y que la inhibición de la movilización de calcio causada por esta fracción es dependiente de la concentración, con una IC_{50} de $27.8 \pm 1.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 6.7). Estos resultados sugieren que la fracción **PA-4K** causa un decremento en la activación de los receptores CXCR4.

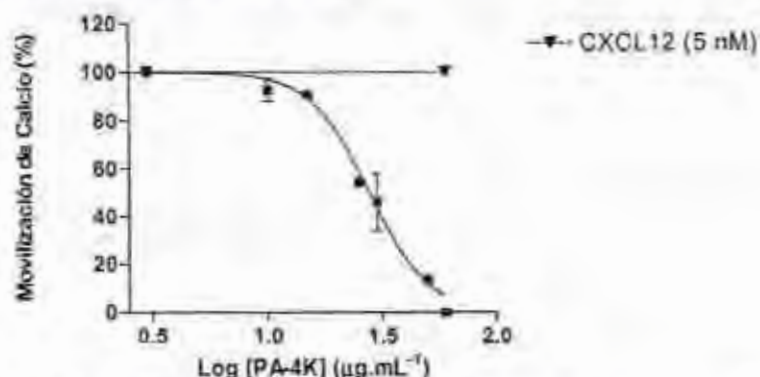


Figura 6.7. Evaluación de la fracción **PA-4K** sobre la movilización de calcio intracelular en células HEK-293 EGFP-CXCR4. Las células fueron preincubadas a concentraciones entre 3 y $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la fracción **PA-4K** y la liberación de calcio fue inducida por el agonista CXCL12 (5 nM). Los resultados fueron normalizados con base al valor de saturación del indicador (Indo-1) en presencia de digitonina, considerando el 100% de la movilización de calcio a la respuesta obtenida en presencia de únicamente CXCL12 (5 nM). El gráfico muestra el error estándar para tres experimentos independientes.

Para evaluar el efecto de la fracción **PA-4K** sobre la producción del AMPc se utilizaron células HEK-293 EGFP-CXCR4 estimuladas con forskolina (FSK), que actúa sobre la AC aumentando los niveles de AMPc. Estas células, al ser tratadas con concentraciones crecientes del agonista CXCL12, mostraron una disminución gradual de la producción de AMPc (curva A, Figura 6.8). Por otra parte, las células tratadas con el antagonista T134 (1 μM) mostraron que existe una competencia entre el agonista CXCL12 y el antagonista T134, debido a que cuando se encuentran en presencia del antagonista, son necesarias mayores concentraciones del agonista CXCL12 para observar la inhibición de la producción del AMPc, que cuando el antagonista está ausente, observándose el desplazamiento característico hacia la derecha de la curva dosis-respuesta de la quimiocina CXCL12 en la producción de AMPc (curva B, Figura 6.8). La evaluación de

la fracción **PA-4K** en este ensayo demostró que, a concentraciones crecientes del agonista CXCL12, la fracción produce un desplazamiento a la derecha en la curva dosis-respuesta de la producción del AMPc, que es mayor conforme aumenta la concentración de la fracción (curvas C y D, Figura 6.8). Estos resultados, similares a los observados para el caso del antagonista T134, confirman la presencia de un antagonista competitivo contra el eje de activación CXCL12/CXCR4 en la fracción **PA-4K** (Figura 6.8).

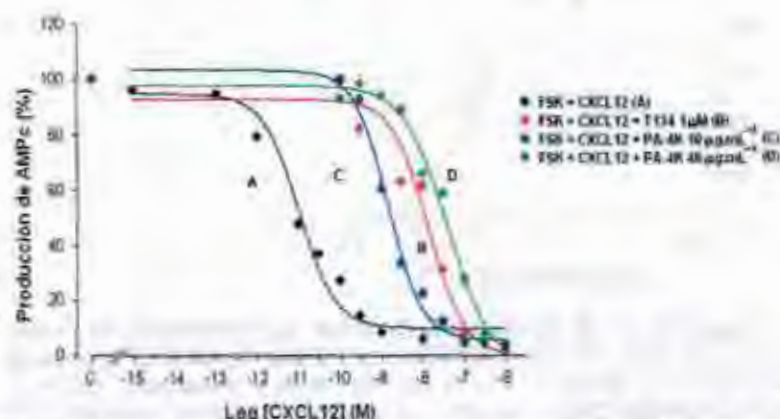


Figura 6.8. Inhibición dosis dependiente en la producción de AMPc en células HEK-293 EGPF-CXCR4. Las evaluaciones se realizaron en presencia de forskolina (FSK) a concentraciones crecientes de CXCL12. El gráfico muestra la curva de inhibición dosis-dependiente del AMPc para el agonista CXCL12 (A); en presencia del antagonista T134 como testigo positivo (B); y en presencia de la fracción PA-4K a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) y a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D).

Como ya se ha mencionado, los receptores a quimiocina pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Los GPCRs comprenden más de mil receptores que se clasifican, con base en sus características estructurales, en seis familias. La mayoría de los receptores se ubican dentro de las familias A (receptores tipo rodopsina/ β -adrenérgicos), B (receptores tipo glucagon/VIP/calcitonina) y C (receptores metabotrópicos) (Gether *et al.*, 2000). Los receptores a quimiocina como el receptor CXCR4 se incluyen en la familia A de los GPCRs. Con el objetivo de probar la especificidad de la actividad inhibitoria de fracción **PA-4K** en el receptor a quimiocina CXCR4, se estudió la actividad de la fracción **PA-4K** sobre el receptor muscarínico de subtipo M_3 y el receptor CCR5 en la

movilización de calcio intracelular. Estos dos receptores se encuentran acoplados a proteínas G que también pertenecen a la familia A. El receptor muscarínico de subtipo M_3 se encuentra expresado, de manera endógena, en la línea celular HEK-293 (Mundell *et al.*, 2000), en tanto que el receptor CCR5 fue transfectado establemente en la línea HEK-293. Al evaluar el efecto de la fracción **PA-4K** sobre el receptor muscarínico M_3 se observó que la amplitud de la respuesta inducida por el agonista muscarínico carbacol, es la misma en ausencia (curva roja, Figura 6.9a) que en presencia (curva azul, Figura 6.9a) de la fracción **PA-4K** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Lo anterior demostró que la fracción **PA-4K** no inhibe la movilización del calcio intracelular cuando se induce la respuesta mediante la incorporación de carbacol y a la concentración en la que se observa la inhibición completa de la movilización del calcio cuando se produce la inducción por CXCL12. La evaluación de la fracción **PA-4K** sobre los receptores a quimiocina CCR5 mostró que el agonista CCL5 (15 nM) induce la respuesta de calcio (curva roja, Figura 6.9b) y que la fracción **PA-4K** ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inhibe la respuesta de calcio inducida por el agonista CCL5 (curva azul, Figura 6.9b).

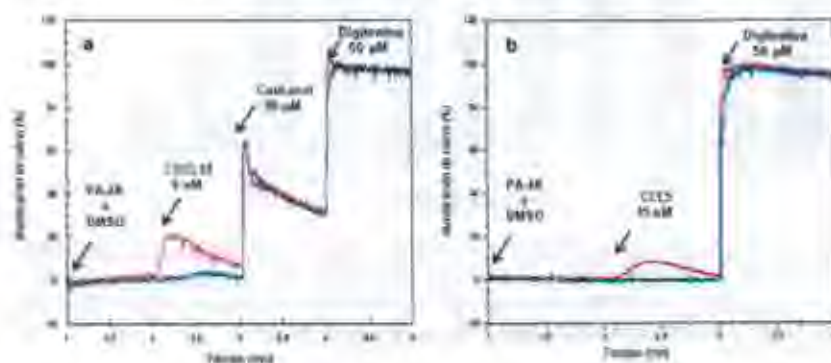


Figura 6.9. Movilización de calcio intracelular por activación de quimiocinas en células HEK-293 EGPF-CXCR4 o HEK-293 CCR5, en presencia de la fracción **PA-4K**: a) Actividad de la fracción **PA-4K** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, azul) o DMSO-testigo (rojo) al minuto 1; cuando se induce la movilización de calcio por la acción de CXCL12 (5 nM) sobre el receptor CXCR4 (minuto 2); cuando se induce la movilización de calcio por la acción de carbacol ($50 \mu\text{M}$) sobre el receptor muscarínico M_3 (minuto 3); y el calcio total que se detecta al adicionar digitonina ($50 \mu\text{M}$) (saturación del marcador indo-1, minuto 4). b) Actividad de la fracción **PA-4K** ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, azul) o DMSO-testigo (rojo) al minuto 1; cuando se induce la movilización de calcio por la acción del agonista CCL5 (15 nM) del receptor CCR5 y el calcio total al adicionar digitonina $50 \mu\text{M}$ (minuto 3).

Dados los resultados obtenidos con la fracción **PA-4K** como inhibidor de la unión de CXCL12/CXCR4, se obtuvieron cantidades adicionales de esta fracción proveniente del extracto orgánico crudo obtenido de una segunda colecta de material vegetal. La purificación por HPLC en fase reversa de una fracción con un perfil cromatográfico similar a la fracción **PA-4K**, dio lugar a la obtención de las fracciones **PA-5A-5J** cuya evaluación sobre la movilización de calcio intracelular inducida por CXCL12, permitió identificar a las fracciones **PA-5C**, **PA-5D** y **PA-5F** como las de mayor actividad (94.5, 86.2 y 84.5% de inhibición, respectivamente; Figura 6.10).

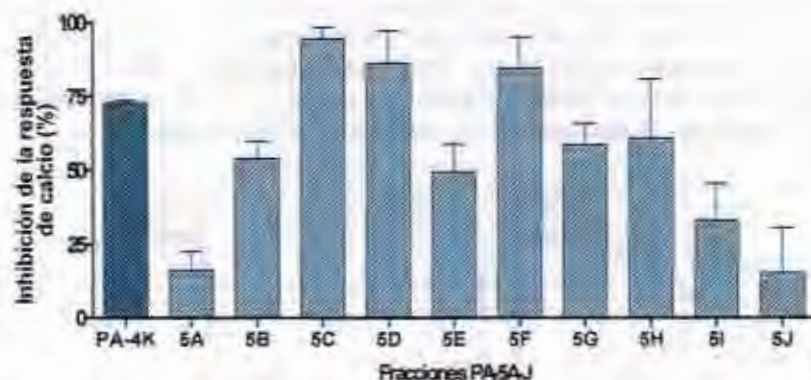


Figura 6.10. Inhibición de la movilización del calcio intracelular en células HEK-293 EGPF-CXCR4. El gráfico muestra las medias del efecto de las fracciones PA-4K, PA-5A-5J ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre la amplitud de la respuesta inducida por CXCL12 (5 nM) con el error estándar para dos experimentos independientes.

El análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC de las fracciones activas **PA-5C**, **PA-5D** y **PA-5F** (Figura 6.11) mostró que la composición de la fracción **PA-5D** es diferente y que contiene un componente mayoritario.

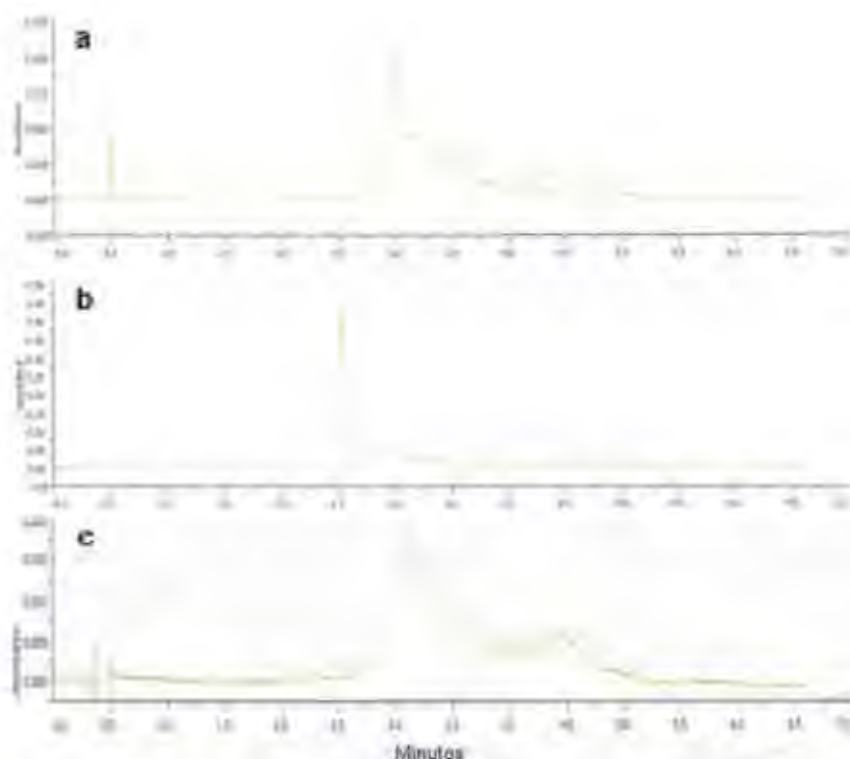


Figura 6.11. Perfiles cromatográficos por HPLC en fase reversa de las fracciones PA-5C, PA-5D y PA-5F. Se inyectaron 20 μL de una solución $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada una de las fracciones; se utilizó una columna Luna C18 (2) $50\times 4.6 \text{ mm } 5 \mu\text{M } 110\text{\AA}$, con un sistema de $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ 50 mM pH=7.4 (disolvente A) y MeOH (disolvente B) en gradiente (0-0.7 min 100% A, 3.2-3.7 min 100% B y 3.9-6.7 min 100% A), con un flujo de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y una detección a 280 nm. a) Perfil cromatográfico de la fracción PA-5C; b) Perfil cromatográfico de la fracción PA-5D y c) Perfil cromatográfico de la fracción PA-5F.

La comparación por co-cromatografía por HPLC en fase reversa de los perfiles cromatográficos de las fracciones **PA-5D** y **PA-4K** mostró que el componente mayoritario de la fracción **PA-5D** corresponde al componente a t_R 4.2 en el perfil cromatográfico de la fracción **PA-4K** (Figura 6.12). La fracción **PA-5D** presentó un bajo rendimiento (0.7%, 1.4 mg), por lo que purificaciones adicionales son necesarias para la identificación de los componentes presentes en esta fracción.

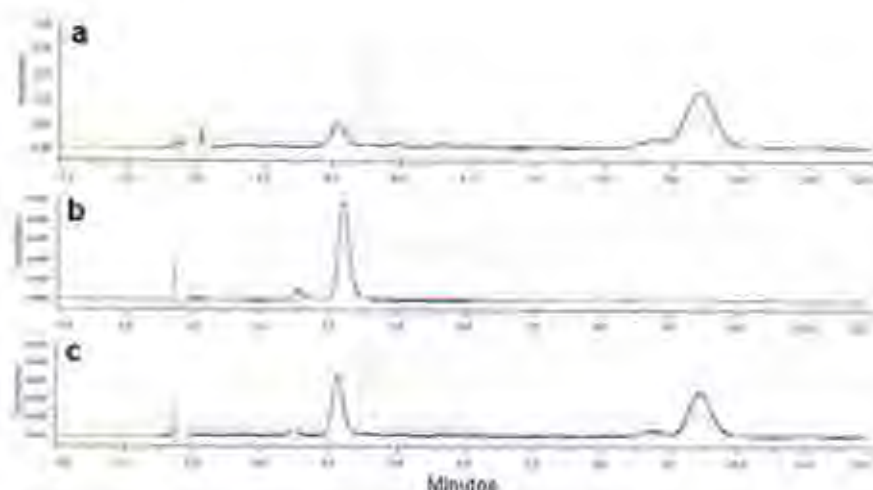


Figura 6.12. Perfiles cromatográficos y co-cromatografía por HPLC en fase reversa de las fracciones PA-4K y PA-5D. Se inyectaron 20 µL de las fracciones en solución; a) PA-4K (1 mg.mL⁻¹), b) PA-5D (500 µg.mL⁻¹) y c) Mezcla de PA-4K (500 µg.mL⁻¹) y PA-5D (250 µg.mL⁻¹); se utilizó una columna Gemini NX C18 150×4.6 mm 5µ, con un sistema isocrático de 80% H₂O acidificado con 0.1% TFA (solvente A) y 20% de MeOH (solvente B), con un flujo de 2 mL·min⁻¹ y una detección a 280 (naranja) y 330 nm (azul).

La respuesta inhibitoria observada para la fracción **PA-4K** en la movilización de calcio inducida por CXCL12 y CCL5 podría deberse a la presencia de, al menos, dos componentes que actúan de manera selectiva sobre cada uno de los ejes de activación CXCL12/CXCR4 y CCL5/CCR5, o de componentes que actúan de manera no selectiva sobre estos ejes de activación. Aun cuando, hasta ahora, los reportes de metabolitos de plantas con actividad inhibitoria contra los receptores CXCR4 y CCR5 son escasos, algunos polifenoles como los taninos frecuentemente obtenidos de plantas, presentan una alta afinidad por proteínas que puede ser de manera selectiva o no selectiva (Haslam *et al.*, 1989), se conoce que el ácido tánico, un componente del extracto acuoso de los frutos de *Forsythia suspensa*, posee actividad inhibitoria selectiva al eje CXCL12/CXCR4 (Chen *et al.*, 2003); asimismo, el alcaloide animabina, obtenido de los tallos de *Aniba sp.* (Jayasuriya *et al.*, 2004); los productos fenolicos 2,3-dihidroxi-4-metoxi-6,6,9-trimetil-5H-dibenzo[b,d]pirano, 8-metoxi-2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-2H-1-benzopirano-6-ol y ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico, aislados de *Wigandia urens* (Cao *et al.*, 2003), y el triterpeno semisintético

de tipo lupano 30-oxo-calenduladiol (Barroso-González *et al.*, 2009), han sido reportados como inhibidores del receptor CCR5. Finalmente, se ha reportado otro compuesto fenólico de origen sintético, la chalcona (E)-1-(4'-clorofenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona, que es un inhibidor selectivo del eje de activación CXCL12/CXCR4 con un novedoso mecanismo de acción que neutraliza a la quimiocina CXCL12 (Hachet-Haas *et al.*, 2008).

La actividad antagonista presentada por los metabolitos de naturaleza polar de *P. andrieuxii* contra los receptores de quimiocina CXCR4 y CCR5, refleja su potencial como posibles fármacos, o modelos para los mismos, para el tratamiento de diferentes patologías, incluyendo la infección por VIH. Al mismo tiempo, estos resultados demuestran la utilidad de ensayos específicos como la unión de CXCL12-TR/EGFP-CXCR4 para la búsqueda de metabolitos bioactivos a partir de extractos crudos de plantas.

6.4 REFERENCIAS

- Abraham, M., Biyder, K., Begín, M., Wald, H., Weiss, I.D., Galun, E., Nagler, A. and A. Peled (2007). *Enhanced unique pattern of hematopoietic cell mobilization induced by the CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003*. Stem Cells, 25, 2158-2166.
- Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J. L., Delepiere, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H. and F. Arenzana-Seisdedos (1999) J. Biol. Chem. 274, 23916-23925.
- Arakaki, R., Tamamura, H., Premanathan, M., Kanbara, K., Ramanian, S., Mochizuki, K., Baba, M., Fujii, N. and H. Nakashima (1999). J. Virology, 73, 1719-1723.
- Arenzana-Seisdedos, F. and M. Parmentier (2006). *Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands*. Semin Immunol. 18, 387-403.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., Nicolas, J.F., Latger-Cannard, V., Bensoussan, D., Bordigoni, P., Baleux, F., Le Deist, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F. and F. Bachelier (2005). *WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12*. Blood, 105, 2449-2457.
- Balkwill, F., (2004) *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4*. Seminars in Cancer Biol. 14, 171-179.
- Barroso-González, J., Jaber-Vazdekis, N. E., García-Expósito, L., Machado, J. D., Zárate, R., Ravelo, A. G., Estévez-Braun A. and A. Valenzuela-Fernández (2009) *The lupane-type triterpene 30-oxo-calenduladiol is a CCR5 antagonist with anti-HIV-1 and anti-chemotactic activities*. J. Biol. Chem. 284, 16609-16620.
- Berger, E.A., Murphy, P.M. and J.M. Farber (1999) *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol. 17, 657-700.

- Busillo, J.M. and J.L. Benovic (2007) *Regulation of CXCR4 signaling*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768, 952-963.
- Cao, S., Rossant, C., Ng, S., Buss, A. D. and M. Butler (2003) *Phenolic derivatives from Wigandia urens with weak activity against the chemokine receptor CCR5*. *Phytochemistry* 64, 987-990.
- Chen, X., Beutler, J.A., McCloud, T.G., Loehfelm, A., Yang, L., Dong, H.F., Chertov, O.Y., Salcedo, R., Oppenheim, J.J. and O.M.J. Howard (2003) *Tannic Acid Is an Inhibitor of CXCL12 (SDF-1 α)/CXCR4 with Antiangiogenic Activity*. *Clinical Cancer Research* 9, 3115-3123.
- Cocchi, F. DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. and P. Lusso (1995). *Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8C T cells*. *Science* 270, 1811-15.
- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G. and S.R. Sprang, (1994) *Structures of active conformations of G α 1 and the mechanism of GTP hydrolysis*. *Science* 265, 1405-1412.
- De Jong, L. A. A., Ugesa, D. R. A., Franke, J. P. and Bischoff, R. (2005). *Ligand binding assays: technologies and applications*. *J. Chromatography B* 829, 1-25.
- Franchet, C., Galzi, J.-L., Gullier, F., Hibert, M. and F. Pattus (2006) *Process for ligands of biological macromolecules using fluorescence transfer of collections of traceable molecules*. *French Patent 2 871 464 (8 septembre 2006)*, *WO2006003329, (12 janvier 2006)*.
- Fredriksson, R. and H.B. Schioth (2005). *The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes*. *Mol Pharmacol.* 67, 1414-1425.
- Galzi, J.-L. and P. Alix (2006) *On the use of a fluorescent protein to detect target protein ligand interactions*. *Europe patent 0 986 759 (26 avril 2006)*; *French patent 97.06977 (5 juin 1997)*.
- Gether, U. (2000) *Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors*. *Endocrine Rev.*, 21, 90-113.

- Gicquiaux, H., Lecat, S., Gaire, M., Dieterlen, A., Mely, Y., Takeda, K., Bucher, B. and J.L. Galzi, (2002) *Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide YY1 receptor*. J. Biol. Chem., 277, 6645-6655.
- Haslam, E. (1989) *Plant polyphenols: vegetable tannins revisited*, Cambridge University Press; Cambridge, U.K. Ch 4, pp. 162-177.
- Hachet-Haas, M., Balabanian, K., Rohmer, F., Pons, F., Franchet, C., Lecat, S., Chow, K.Y.C., Dagher, R., Gizzi, P., Didier B., Laganés, B., Kellenberg, E., Bonnet, D., Baleux, F., Halech, J., Parmentier, M., Frossard, N., Arenzana-Seisdedos, F., Hibert, M. and J.L. Galzi (2008) *Small neutralizing molecules to inhibit actions of chemokine CXCL12*. J. Biol. Chem. 283, 23189-23199.
- Jayasuriya, H., Herath, K. B., Ondeyka, J. G., Polishook, J. D., Bills, G. F., Dombrowski, A. W., Springer, M. S., Siciliano, S., Malkowitz L., Sanchez, M., Guan, Z., Tiwari, S., Stevenson, D. W., Borris, R. P. and B. Singh (2004) *Isolation and structure of antagonists of chemokine receptor (CCR5)*. J. Nat. Prod. 67, 1036-1038.
- Lataillade, J.J., Domenech, J. and M.C. Le Bousse-Kerdiles (2004). *Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)\CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking*. Eur Cytokine Netw., 15,177-188.
- Liles, W.C., Broxmeyer, H.E., Rodger, E., Wood, B., Hübel, K., Cooper, S., Hangoc, G., Bridger, G.J., Henson, G.W., Calandra, G. and D.C. Dale (2003). *Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist*. Blood, 102, 2728-2730.
- Mundell, S.J. and Benovic, J.L. (2000). *Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells*. J. Biol. Chem. 275, 12900-12908.
- Murdoch, C. (2000) *CXCR4: chemokine receptor extraordinaire*. Immunol. Rev. 177, 175-184.

- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M. and B. Moser (1996). *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. *Nature*, 382, 833-835.
- Pazos, A. (2004) "Acciones de los fármacos I. Interacciones fármaco receptor" En: *Farmacología humana* Flores, J. (Ed.) Elsevier Masson, Barcelona, España, pp. 7.
- Perry, S.J. and R.J. Lefkowitz (2002) *Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation*. *Trends Cell Biol.*, 12, 130-138.
- Proudfoot, A.E., Power, C.A. and M.K. Schwarz (2010). *Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future?* *Expert Opin. Investig. Drugs*, 19, 345-355.
- Ribeiro, S. and R. Horuk (2007). "Pharmaceutical Targeting of Chemokine Receptors" in *The chemokine receptor* Harrison, J.K. and Lukacs, N.W. (eds) Humana press, pp. 371-390.
- Shenoy, S. and R.J. Lefkowitz (2003). *Multifaceted roles of b-arrestins in the regulation of seven-membranespanning receptor trafficking and signaling*. *J. Biochem.*, 375, 503-515.
- Slagsvold, T., Marchese, A., Brech, A. and H. Stenmark (2006). *C/ISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4*. *EMBO J.* 25, 3738-3749.
- Tamamura, H., Tsutsumi, H. and N. Fujii (2006). *The chemokine receptor CXCR4 as a therapeutic target for several diseases*. *Mini Rev. Med. Chem.* 6, 989-995.
- Tsutsumi, H., Tanaka T., Ohashi N., Masuno H., Tamamura H., Hiramatsu H., Araki T., Ueda S., Oishi S. and N. Fujii (2006). *Therapeutic potencial of the chemokine receptor CXCR4 antagonist as multifunctional agents*. *Peptide Science*, 88, 279-289.

- Valenzuela-Fernández, A., Palanche, T., Amara, A., Magerus, A., Altmeyer, R., Delaunay, T., Virelizier, J.L., Baleux, F., Galzi, J.L. and F. Arenzana-Seisdedos (2001). *Optimal Inhibition of X4 HIV Isolates by the CXCL12 Chemokine Stromal Cell-derived Factor 1α Requires Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans*. J. Biol. Chem., 276, 26550-26558.
- Venkatesan, S., Yose, J.J., Lodge, R., Murphy, P.M. and J.F. Foley (2003). *Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4*. Mol. Biol. Cell., 14, 3305-3324.
- Vollmer, J. Y., Alix, P., Chollet, A., Takeda, K., and J.L. Galzi (1999). *Subcellular compartmentalization of activation and desensitization of responses mediated by NK2 neurokinin receptors*. J. Biol. Chem. 274, 37915-37922.
- Wong, D. and W. Korz (2008). *Translating an antagonist of chemokine receptor CXCR4: from bench to bedside*. Clin. Cancer Res. 14, 7975-7980.

CAPÍTULO 7

Conclusiones generales y perspectivas

En un estudio anterior sobre la bioprospección de plantas medicinales nativas de la península de Yucatán, se encontró que el extracto crudo de raíces de *C. greggii* posee actividad antimicrobiana, citoestática, antiplasmódica y tripanocida, mientras que el extracto orgánico crudo de *P. andrieuxii* posee actividad leishmanicida. En el presente trabajo, estos extractos orgánicos crudos fueron purificados biodirigidamente por la actividad leishmanicida, antiplasmódica, tripanocida y por una nueva actividad detectada contra el eje CXCL12/CXCR4, así mismo los metabolitos obtenidos de forma pura y sus derivados semisintéticos fueron evaluados para detectar actividad citotóxica y citoestática.

El fraccionamiento del extracto crudo de hojas de *P. andrieuxii* permitió ubicar a los metabolitos con actividad leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica en la fracción de baja polaridad, y a los metabolitos que interaccionan con la asociación CXCL12/CXCR4 en la fracción de alta polaridad. De igual manera, el fraccionamiento del extracto crudo de raíces de *C. greggii* mostró que los metabolitos responsables de la actividad antiprotozoaria se encuentran repartidos en las fracciones de baja y media polaridad.

La purificación de la fracción de baja polaridad de *P. andrieuxii* resultó en el aislamiento e identificación de ácido betulínico y taraxasterol, en tanto que el ácido ceanoténico, el ácido ceanótico, la discarina B, la crisofaneína, el ácido betulínico y un nuevo producto natural identificado como ácido 3-O-acetilceanótico fueron aislados de las fracciones bioactivas de baja y media polaridad de *C. greggii*. Este es el primer reporte sobre la ocurrencia de los metabolitos antes mencionados en estas dos especies vegetales.

La evaluación en la actividad antiprotozoaria del ácido betulínico demostró que este triterpeno contribuye a la actividad antimalárica y tripanocida de *P. andrieuxii* y *C. greggii*, pero no a la actividad leishmanicida. Adicionalmente se encontró que el ácido 3-O-acetilceanótico y el ácido ceanoténico, ambos metabolitos aislados de *C. greggii*, poseen una moderada actividad leishmanicida y que éstos, junto con la discarina B

y la crisofaneína poseen una baja actividad tripanocida. Debido a los bajos o moderados niveles de actividad encontrados para los metabolitos aislados, es posible que la actividad originalmente detectada en el extracto crudo se deba a un efecto de sinergismo entre los metabolitos presentes en las diferentes fracciones. Adicionalmente, ninguno de los metabolitos aislados de *C. greggii* presentaron actividad citoestática, por lo que son necesarios estudios encaminados a obtener estos metabolitos o comprobar un posible efecto sinérgico entre estos.

La evaluación de los derivados acetylado, oxidado, metilado del ácido betulínico así como de betulina, mostró que mientras las modificaciones en la posición C-3 de la estructura del ácido betulínico aumentan la actividad leishmanicida (e.g. acetato de ácido betulínico y ácido betulínico), las modificaciones en las posiciones C-3 o C-28 de todos los derivados probados, disminuyen la actividad tripanocida. Así mismo, los derivados acetylado, dimetilado y acetyl dimetilado del ácido ceanótico, mostraron que la presencia de los grupos oxhidrilo en C-3 y carbonilo en C-28 del esqueleto de los ceanotanos no es esencial para la expresión de actividad leishmanicida y tripanocida. Adicionalmente, otras modificaciones en estas estructuras como las aminaciones u otras esterificaciones, podrían enriquecer estos estudios.

Las evaluaciones realizadas con la fracción de polaridad alta de *P. andrieuxii* y sus fracciones de purificación, permitió establecer la presencia de metabolitos con actividad antagonista al eje de activación CXCL12/CXCR4 y al eje CCL5/CCR5, por lo que estos estudios muestran la importancia de esta planta como fuente de moléculas con actividad biológica sobre novedosos blancos terapéuticos y posiblemente como inhibidores de la entrada del VIH. Asimismo, estos resultados, muestra la utilidad de los ensayos de unión de CXCL12/CXCR4, internalización de EGFP-CXCR4, así como los ensayos sobre los segundos mensajeros AMPc y calcio intracelular para la detección y purificación de moléculas con actividad contra el eje CXCL12/CXCR4. Sin embargo, es necesario llevar a cabo la purificación final e identificación de los componentes bioactivos, así como más estudios de selectividad en otros receptores a quimiocinas.

Con todo lo anterior, se alcanzó el objetivo general de este trabajo lográndose el aislamiento e identificación de metabolitos bioactivos en las dos plantas en estudio y con base en los resultados obtenidos se demuestra la importancia de estas plantas en la producción de metabolitos con actividad antiprotozoaria y de *P. andrieuxii* contra el eje de activación

CXCL12/CXCR4. La continuación de estudios sobre las actividades antiprotozoarias para determinar si se trata de un efecto sinérgico entre los metabolitos aislados, así como la realización de otros bioensayos para determinar el probable sitio de acción de los metabolitos aislados y la búsqueda de metabolitos con actividad citoestática, son necesarias.

