



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Nuevos inhibidores de la calmodulina de las especies fúngicas *Purpureocillium lilacinum* e
Isaria fumosorosea

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. Abraham Madariaga Mazón

Tutora: Dra. Rachel Mata Essayag
Facultad de Química

Comité Tutor:
Dra. Martha L. Macías Rubalcava
Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Instituto de Química

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL	Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas
VOCAL	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano
VOCAL	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
SECRETARIO	Dra. Adela Rodríguez Romero

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 124, Edificio E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

ARTÍCULOS

Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., Mata, R. 2014. Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamides. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Aceptado, *In Press*.

Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., Toriello, C., Navarro-Barranco, H., Mata, R. 2014. Potent anti-calmodulin activity of cyclotetrapeptides isolated from *Isaria fumosorosea* using a newly designed biosensor. *Natural Product Communications*. Aceptado, *In Press*.

Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., González, M.D.C., Glenn, A.E., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. 2013. Absolute configuration of acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Natural Products*, 76 (8) 1454-1460.

CONGRESOS

55th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: **Calmodulin inhibitor properties of beauverolides isolated from *Paecilomyces fumosoroseus***. Agosto, 2014. Oxford, Mississippi, EUA.

10^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Cartel: **Beuverólidas aisladas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su evaluación como inhibidores de la calmodulina**. Mayo, 2014. Mérida, Yucatán, México.

QUIMIUNAM. Cartel. **Determinación de la configuración absoluta de la acremoxantonaC, un potente inhibidor de la calmodulina**. Noviembre, 2013, México, D.F., México.

54th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: **Absolute configuration at the stereocenters of Acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Paecilomyces lilacinus***. Julio, 2013. St. Louis, Missouri, EUA.

54th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: **Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamides**. Julio, 2013. St. Louis, Missouri, EUA.

8^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Cartel: **Aislamiento, caracterización estructural y actividad biológica del compuesto *Acremoxantona C* sobre la proteína calmodulina obtenido de la especie fúngica *Paecilomyces lilacinus***. Mayo, 2012. Bahías de Huatulco, Oaxaca, México.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través del Posgrado en Ciencias Químicas, me permitió continuar y enriquecer mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para realizar mis estudios de doctorado (becario No. 223428).

Al financiamiento aportado por los proyectos DGAPA IN212913 y CONACyT 150966 para la realización del presente proyecto de investigación.

A la Dra. Rachel Mata, mi más profundo agradecimiento, quien a través de sus enseñanzas, conocimiento y paciencia, supo guiarme por el camino de la investigación. Por ser siempre un ejemplo de tenacidad y de constante superación.

A la Dra. Martha Macías Rubalcava y el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, miembros del Comité Tutor, que a lo largo del desarrollo del proyecto de investigación aportaron comentarios y observaciones útiles para enriquecer el trabajo final.

A los miembros del jurado asignado, por tomarse el tiempo necesario para emitir observaciones y comentarios al presente escrito.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez y la Dra. Isabel del C. Rivero Cruz, por el apoyo técnico y la constante asesoría brindada para la realización de este proyecto.

A la Dra. María del Carmen González Villaseñor y a la Dra. Genoveva García Aguirre, del Instituto de Biología, UNAM, así como a la Dra. Concepción Toriello de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las muestras fúngicas objeto de estudio.

Al Dr. Carlos Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), por su valiosa asesoría en el desarrollo de los cálculos computacionales.

Al Dr. Martín González Andrade de la Facultad de Medicina, UNAM, por el apoyo en la realización y registro de los experimentos de fluorescencia con los biosensores.

Al Dr. Samuel Estrada Soto, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por el apoyo para la realización de los experimentos de vasorrelajación.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) de la UNAM, por el tiempo de cómputo otorgado para llevar a cabo los cálculos teóricos a través de su sistema de supercómputo KanBalam, ahora Miztli.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 124, que a través de pláticas, discusiones, desveladas, risas y demás, el trabajo en el laboratorio se vio enriquecido y muy ameno.

DEDICATORIAS

Índice	Página
Lista de Figuras	iv
Lista de Cuadros y Tablas	vi
Lista de Abreviaturas	vii
1. Resumen	1
2. Antecedentes	5
2.1 Calmodulina	5
2.2 Estructura de la Calmodulina	6
2.3 Blancos moleculares regulados por la CaM	8
2.4 La calmodulina como herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos	11
2.5 Productos de origen natural con actividad anti-CaM	20
2.6 El género <i>Paecilomyces</i>	26
2.6.1 Metabolitos selectos de especies del genero <i>Paecilomyces</i>	27
2.6.2 Antecedentes de la especie objeto de estudio <i>Purpureocillium lilacinum</i> (sinon. <i>Paecilomyces lilacinus</i>)	30
2.6.2.1 Metabolitos aislados de <i>P. lilacinum</i>	31
2.6.3 Antecedentes de la especie objeto de estudio <i>Isaria fumosorosea</i> (sinon. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>)	33
2.6.2.3.1 Metabolitos aislados de <i>Isaria fumosorosea</i>	33
3. Justificación	37
4. Objetivos	37
4.1 Objetivos particulares	37
5. Parte Experimental	38
5.1 Material fúngico	38

5.2	Análisis cromatográfico	39
5.3	Fermentación de las especies fúngicas objeto de estudio	40
5.4	Preparación de los extractos orgánicos	40
5.5	Estudio químico de la especie fúngica <i>Purpureocillium lilacinum</i>	41
5.5.1	Fraccionamiento del extracto orgánico	41
5.5.2	Aislamiento, purificación e identificación de la acremonidina A (119) y de la acremoxantona C (122)	41
5.6	Estudio químico de la especie <i>Isaria fumosorosea</i>	42
5.6.1	Fraccionamiento del extracto orgánico	42
5.6.2	Análisis por CLUE-EM de la fracción FPfII-s	42
5.6.3	Establecimiento del perfil cromatográfico de la fracción FPfII-s	42
5.6.4	Obtención de los metabolitos secundarios de la especie <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> a partir de la fracción FPfII-s	43
5.7	Obtención de las malbranqueamidas (51-53) a partir de la especie fúngica <i>Malbranchea aurantiaca</i>	43
5.8	Ensayos biológicos	44
5.8.1	Apagamiento de la fluorescencia del biosensor de calmodulina <i>hCaMM124C-mBBr</i>	44
5.8.1.1	Diseño del biosensor de calmodulina <i>hCaMT110C-mBBr</i>	45
5.8.2	Actividad vasorrelajante de las malbranqueamidas sobre anillos de aorta de rata	46
5.8.2.1	Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante	48
5.9	Cálculos de modelado molecular	48
5.9.1	Preparación de las estructuras	48
5.9.2	Análisis conformacional, optimización geométrica y cálculos de propiedades físicas	49
5.9.3	Acoplamiento y reconocimiento molecular	50
5.10	Análisis estadístico	

6. Resultados y Discusión	
6.1 Obtención y caracterización de los inhibidores de CaM de <i>Purpureocillium lilacinum</i>	52
6.1.1 Cálculos de modelado molecular para la determinación de la configuración absoluta en los centros estereogénicos de 122	63
6.1.2 Evaluación de la actividad anti-CaM de los compuestos 121 y 122 con el biosensor de CaM <i>hCaMM124C-mBBr</i>	70
6.2 Obtención y caracterización de los metabolitos activos de <i>Isaria fumosorosea</i> (sinonimia <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>)	75
6.2.1 Evaluación de la actividad anti-CaM de las beauverólidas (112 - 119)	81
6.3 Actividad vasorrelajante de las malbranqueamidas (51-53)	85
7. Conclusiones	97
8. Bibliografía	100
9. Anexo	110

Lista de Figuras

	Página	
Figura 1.	Conformaciones adoptadas por la proteína CaM: a) <i>apo</i> -CaM (pdb 1CFD) y b) <i>holo</i> -CaM (CaM-Ca ²⁺ , pdb 1CLL). Los iones calcio están representados por esferas amarillas.	7
Figura 2.	A) Distribución de aminoácidos hidrofóbicos (superficie blanca y roja) y polares (superficie azul) en la conformación <i>holo</i> -CaM (pdb 1CLL). B) Localización de las metioninas (bastones y esferas naranjas) en las cadenas laterales y parche hidrofóbico de la conformación abierta de CaM (pdb 1CLL).	8
Figura 3.	Localización y función de las principales proteínas de unión a calmodulina.	9
Figura 4.	Estructura de complejos formados entre Ca ²⁺ -CaM (listones azul marino) y, algunos péptidos de enzimas blanco. Figuras preparadas con Chimera 1.8.1.	10
Figura 5.	Modelo in silico de la mutación del residuo de cisteína y la unión del bimano. Las líneas rojas muestran los residuos de aminoácidos del sitio de unión en el complejo CaM-TFP, en verde se muestra el <i>mBBr</i> , en naranja a la TFP y las esferas amarillas muestran los iones de calcio (Tomado de González-Andrade, <i>et al.</i> , 2009).	14
Figura 6.	Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de fuentes animales.	21
Figura 7.	Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de plantas.	22
Figura 8.	Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de algunos microorganismos.	23
Figura 9a.	Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de fuentes fúngicas.	25
Figura 9b.	Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de fuentes fúngicas.	26
Figura 10.	Metabolitos aislados de algunas especies de <i>Paecilomyces</i> sp.	27
Figura 11.	Metabolitos aislados de las especies <i>P. variotii</i> y <i>P. militaris</i> .	28
Figura 12.	Metabolitos aislados de la especie <i>P. farinosus</i> .	29
Figura 13a.	Metabolitos aislados de la especie <i>P. tenuipes</i> .	29
Figura 13b.	Metabolitos aislados de la especie <i>P. tenuipes</i> .	30
Figura 14.	Paecilotoxinas aisladas de <i>Purpureocillium lilacinum</i> .	31
Figura 15.	Metabolitos aislados de <i>Purpureocillium lilacinum</i> .	32
Figura 16.	Metabolitos aislados de <i>I. fumosorosea</i> .	34

Figura 17.	Beauverólidas presentes en la especie <i>I. fumosorosea</i> .	35
Figura 18.	Cultivo de los hongos (A) <i>Purpureocillium lilacinum</i> y (B) <i>Isaria fumosorosea</i> , crecidos en medio agar papa-dextrosa por 21 días.	38
Figura 19.	Representación esquemática del experimento vasorrelajante de las malbranqueamidas.	48
Figura 20.	Apagamiento de la fluorescencia del biosensor <i>hCaMM124C-mBBr</i> por el extracto orgánico de <i>Purpureocillium lilacinum</i> .	53
Figura 21.	Cromatograma de la fracción FII de <i>P. lilacinum</i> resuelto para la acremonidina A (121 , $t_R = 7.2$ min) y la acremoxantona C (122 , $t_R = 12.2$ min). Columna PurosphereSTAR RP-C18 (4.6 mm x 250 mm) con gradiente: 50% MeCN en agua, a 80% MeCN en 15 minutos, y 100% MeCN por 30 minutos, a un flujo de 0.6 mL/min.	54
Figura 22.	Núcleo general de A) las acremoxantonas, B) las xantquinodinas y C) las beticolinas.	56
Figura 23.	Espectro de (A) ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y (B) ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) de la acremoxantona C (122).	57
Figura 24.	Espectro bidimensional HMBC de la acremoxantona C (122).	58
Figura 25.	Correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales HMBC (flechas verde) y COSY (líneas sólidas azul) para la acremoxantona C (122).	59
Figura 26.	Correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales HMBC (flechas verde) y COSY (líneas sólidas azul) para la acremoxantona C (122).	60
Figura 27.	Estimación <i>a priori</i> de la magnitud de los valores de J en función del ángulo diedro ψ (grados) entre núcleos de interés. Tomado de Bifulco (2007).	62
Figura 28.	Modelos de mínima energía global obtenidos por DFT B3LYP/DGDZVP para los ocho posibles estereoisómeros correspondientes a las series enantioméricas α (A- H, bastones negros) y β (I- P, bastones azules) de 122 .	64
Figura 29.	Modelos de mínima energía (DFT B3LYP/DGDZVP) para los estereoisómeros A y E de 122 , con un fragmento del espectro del experimento bidimensional NOESY mostrando la correlación entre los protones H-1' y H-15'.	66
Figura 30.	Espectro de ^{13}C -RMN totalmente acoplado a protón de 122 (A), superpuesto con un experimento de ^{13}C -RMN desacoplado (B).	68
Figura 31a.	A) Curva de titulación con 121 y espectro de fluorescencia de <i>hCaMM124C-mBBr</i> (5 μM) a saturación con Ca^{2+} (10 mM). B) Ajuste de los máximos de absorción para la determinación de K_d .	70

Figura 31b.	Curvas de titulación de y espectro de fluorescencia de <i>hCaMM124C-mBBr</i> de C) 122 y D) CPZ. Ajuste de los máximos de absorción para la determinación de K_D de E) 122 F) CPZ.	71
Figura 32.	Modelo estructural de los complejos de (listones azul claro). El panel central muestra la interacción de 121 (bastones azules) y 122 (bastones amarillos) con la CaM (código PDB 1XA5). Detalles acerca del modo de unión, los aminoácidos involucrados (bastones blancos) se muestran en los paneles laterales. Imagen diseñada y editada con PyMOL y LigPlus ⁺ .	72
Figura 33.	Sitio de interacción modelado para A) 122 (bastones amarillos), B) 121 (bastones azules) con la CaM (pdb 1XA5), en ambos casos se superpone con el KAR-2 (bastones verdes).	73
Figura 34.	Esquema comparativo entre las posiciones marcadas M124 y T110 de la proteína calmodulina (pdb 1a29) para los biosensores <i>hCaMM124C-mBBr</i> y <i>hCaMT110C-mBBr</i> , respectivamente. Se hace la comparación con las estructuras modeladas de la TFP (bastones naranja,) y KAR-2 (bastones verdes).	74
Figura 35.	Curvas de titulación de <i>hCaMT110C-mBBr</i> ($5\mu\text{M}$, Ca^{2+} 10 mM) a saturación. (A) 122 , 63% de apagamiento, (B) CPZ, 20% de apagamiento.	74
Figura 36.	Cromatograma obtenido por la técnica CLUE-EM para la fracción FPfII-s del extracto orgánico de <i>I. fumosorosea</i> .	76
Figura 37a.	Espectros de masas (ionización por electrospray) para los compuestos más abundantes de la fracción FPfII-s del extracto orgánico de <i>I. fumosorosea</i> .	77
Figura 37b.	Espectros de masas (ionización por electrospray) para los compuestos más abundantes de la fracción FPfII-s del extracto orgánico de <i>I. fumosorosea</i> .	78
Figura 38.	Núcleo general de las beuverólidas.	79
Figura 39.	Cromatograma para la fracción fracción FPfII-s de <i>I. fumosorosea</i> 503-3. Columna: Symmetry C18 250x4.6mm. Fase Móvil: ACN-H ₂ O (90:10). Flujo: 0.5 mL/min. Longitud: 215 nm.	80
Figura 40.	Espectros de fluorescencia de <i>hCaMM124C-AF₃₅₀</i> ($5\mu\text{M}$) a saturación con el ion Ca^{2+} (10 mM), para las beuverólidas (112 – 118). Las muestras fueron excitadas a 257 nm, y los espectros de emisión fueron colectados de 375 nm a 550 nm.	82
Figura 41a.	Sitio de interacción común de los productos 112- 118 (superficie gris) con la CaM (listones azul; los iones calcio se representan como esferas verdes). Se muestra el resultado del docking de la beuverolida J _a (116) en bastones y esferas amarillas, así como el de la TFP (bastones naranjas). Figura reparada con Pymol.	84
Figura 41.	Sitio de interacción de los productos 112- 118 (bastones y esferas) y los residuos de aminoácido involucrados (bastones blancos). Figura reparada con Pymol.	85

Figura 42.	Efecto vasorrelajante de A) malbranqueamida (51), B) malbranqueamida B (52) y c) isomalbranqueamida B (53) en aorta de rata pre-contraída con noradrenalina, en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio.	87
Figura 43.	La prostaciclina (PGI ₂) activa la adenilato ciclasa, promoviendo un aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP). El óxido nítrico (NO) activa la guanilato ciclasa (liberado a través de la reacción enzimática de la eNOS), produciendo un incremento en los niveles de GMP cíclico (cGMP). El factor de hiperpolarización derivado de endotelio (EDHF, por sus siglas en inglés), el cual se ha propuesto que sea K ⁺ , causa que los canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺ en células de músculo liso vascular se abran, conduciendo a su hiperpolarización. AA, ácido araquidónico; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; COX, ciclooxigenasa; SR, receptor de membrana.	89
Figura 44.	Curvas concentración-respuesta vasorrelajante para la malbranqueamida (51) en aorta de rata pre-tratada con (a) atropina, (b) indometacina, (c) L-NAME y (d) tetraetilamonio (TEA); pre-contraída con NA (0.1 μM).	90
Figura 45.	El aumento de calcio (Ca ²⁺) en células de músculo liso, ya sea por entrada a través de canales de Ca ²⁺ mediados por voltaje, o por liberación del retículo endoplásmico (RE) mediada por inositoltrifosfato (IP ₃), promueve la formación del complejo Ca ²⁺ -CaM. Este complejo modula la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC) por parte de la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK), lo que conlleva a un proceso de contracción. La entrada de óxido nítrico (NO) a la célula aumenta la formación de cGMP que a su vez estimula a la fosfatasa de la MLC (MLCP) para revertir el proceso de fosforilación y una consecuente relajación.	92
Figura 46.	Modelo de la eNOS construido a partir de las estructuras cristalizadas del dominio oxigenasa (pdb 3NOS, listones verde oscuro), del dominio reductasa (pdb 1TLL, listones azul) y el complejo del péptido de unión a CaM con la CaM unida (pdb 3HR4, listones verde limón para el péptido de unión y listones café para la CaM). En el dominio oxigenasa se encuentra el grupo Hemo (Hem) representado por bastones rojos, el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) representada por bastones azules y la arginina (bastones magenta). En el dominio reductasa están los cofactores FAD, FMN y NADPH (bastones café). Figura preparada con Pymol.	93
Figura 47.	Formación de NO por catálisis de la eNOS.	94
Figura 48.	Modelo estructural del dominio oxigenasa de la eNOS (PDB 3NOS; listones verde oscuro) mostrando el sitio común de interacción (bastones en verde claro) de los compuestos 51-53.	94
Figura 49.	Detalles del sitio de interacción de (a) 51 en bastones naranja, (b) 52 en bastones verdes y (c) 53 en bastones azules con el dominio oxigenasa de la eNOS (PDB 3NOS).	96
Figura 50.	Modelo para el acoplamiento de la malbranqueamida (bastones esferas naranja), malbranqueamida b (bastones y esferas azules) y la isomalbranqueamida b (bastones y esferas azules) con el péptido de unión a CaM de la eNOS (carón gris) unido a la CaM (cartón amarillo) (PDB 1NIW).	97

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM.	12
Tabla 2. Moléculas con actividad anti-CaM empleadas como fármacos o como herramientas de investigación.	16
Tabla 3. Rendimientos de los extractos obtenidos en diferentes condiciones de crecimiento para <i>P. lilacinum</i> .	52
Tabla 4. Datos espectroscópicos de la acremoxantona C (122) en CDCl ₃ (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).	55
Tabla 5. Valores calculados de $[\alpha]_D$ para los ocho estereoisómeros de la acremoxantona C (122) de la serie enantiomérica β (11'S, 14'R).	65
Tabla 6. Comparación entre acoplamientos selectos de ¹ H- ¹³ C y ¹ H- ¹ H experimentales y calculados (DFT) para los diastereoisómeros A-D de la acremoxantona C (122).	69
Tabla 7. Rendimientos para <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo y condiciones.	75
Tabla 8. Estructura y composición de las beuverólidas identificadas en la fracción FPfII-s.	79
Tabla 9. Resultados obtenidos del estudio teórico de “docking” (ELUE; K_i) en comparación con el resultado experimental (K_d).	83
Tabla 10. Valores de E_{max} y CE_{50} para los compuestos 51-53 evaluados en experimentos con y sin endotelio de aorta de rata.	87
Tabla 11. Parámetros farmacológicos en la determinación del modo de acción de la malbranqueamida.	88
Tabla 12. Resultados del docking para los compuestos 51-53 .	96

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADT	Autodock Tools
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
APD	Agar Papa-Dextrosa
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CaM	Calmodulina
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CLUE	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
CNA	Calcineurina
CPD	Caldo Papa-Dextrosa
CPZ	Clorpromazina
DC	Dicroísmo Circular
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
EE	Error Estándar
EFEB	Energía Libre de Unión Estimada
EM	Espectrometría de Masas
FRET	Resonancia de Fluorescencia de Transferencia de Energía
g	Gramos
GMPc	Guanosin Monofosfato Cíclico
HB	Enlaces de Hidrógeno
HCl	Ácido Clorhídrico
Hex	Hexano
ITS	Espaciador de Traducción Interna
kcal	Kilocalorías
K_d	Constante de Disociación
K_i	Constante de Inhibición
L	Litros
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
L-NAME	Éster metílico de la L-nitroarginina
mBBr	Monobromobirmano
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
Met	Metionina
mg	Miligramos
μm	Micrómetros

μM	Micromolar
mL	Mililitros
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de Cadena Ligera de La Miosina
mm	Milímetros
NA	Noradrenalina
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
PDB	Banco de Información de Proteínas (Protein Data Bank)
PDE1	Enzima Fosfodiesterasa del AMP Cíclico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SEM	Error estándar de la media
TEA	Tetraetilamonio
TFP	Trifluoperazina
t_R	Tiempo de Retención
UV	Ultravioleta
λ_{em}	Longitud de Onda de Emisión
λ_{ex}	Longitud de Onda de Excitación

Resumen

El presente trabajo describe la investigación química de las especies fúngicas *Purpureocillium lilacinum* e *Isaria fumosorosea* con el objetivo de obtener nuevos ligantes de la proteína calmodulina (CaM), potencialmente útiles para el desarrollo de fármacos y/o herramientas de investigación.

El estudio químico de la especie *Purpureocillium lilacinum* condujo al aislamiento de los metabolitos activos acremonidina A (**121**) y cremoxantona C (**122**), heterodímeros de xantona-antraquinona caracterizados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y quiroópticas. La configuración absoluta de los centros estereogénicos C-2, C-3, C-1', C-11' y C-14' de **122** fue establecida como *R, R, S, S, y R*, respectivamente, mediante la comparación de los valores experimentales de rotación óptica específica ($[\alpha]_D$) y constantes de acoplamiento ($^3J_{H-H}$ y $^3J_{C-H}$) con los obtenidos a través de cálculos teóricos utilizando teoría de funcionales de la densidad (DFT) a un nivel B3LYP/DGDZVP.

La actividad anti-CaM de los productos **121** y **122** se determinó mediante el uso de dos biosensores fluorescentes de CaM: *hCaMM124C-mBBR* y *hCaMM124C-T110C*. El primer biosensor permite la detección de ligandos clásicos de la CaM, mientras que el segundo es útil para detectar moléculas que se unen a un sitio diferente al de inhibición clásica. Los ensayos de apagamiento de la fluorescencia de ambos biosensores permitió establecer que **121** y **122** se unen a la CaM con constantes de afinidad de $K_d = 19.40$ y 18.25 nM. El uso del biosensor *hCaMM124C-T110C*, así como estudios teóricos de acoplamiento molecular, permitieron proponer que el sitio de unión a CaM de **121** y **122** es un sitio diferente al clásico, pero similar al sitio donde interactúa el KAR-2.

El estudio químico del extracto orgánico de *Isaria fumosorosea* permitió la obtención de siete metabolitos caracterizados como las beuverólidas L (**112**), C (**113**), F (**114**), I (**115**), J_a (**116**) M (**117**) y N (**118**). La determinación de la actividad ligante de CaM de los productos **112-118** se

determinó mediante el uso del biosensor fluorescente de CaM *hCaMM124C-AF₃₅₀*, además de estudios de acoplamiento molecular para establecer el posible sitio de unión a la CaM. Todos los metabolitos resultaron activos, con constantes de afinidad entre 0.078 μM y 3.44 μM , siendo la beauverólida *J_a* la más afin ($K_d = 0.078 \mu\text{M}$). El estudio de acoplamiento molecular permite sugerir que el sitio de unión de las beauverólidas es similar al de la CPZ.

De manera adicional, y con la finalidad de establecer si las propiedades ligantes de CaM de las malbranqueamidas (51-53) correlacionan con una actividad relajante de la musculatura lisa, se exploró su potencial vasorrelajante. Los resultados indicaron que las malbranqueamidas (51 –53) tienen un efecto relajante dependiente de la concentración y de la presencia de endotelio; en tejidos con ausencia de endotelio el efecto fue menor pero significativo. Los experimentos farmacológicos conducentes a determinar su mecanismo de acción indicaron que los alcaloides ejercen una vasorrelajación mediada principalmente por producción de óxido nítrico (NO) y otros factores. Los resultados de los estudios teóricos de acoplamiento molecular de 51 – 53 con la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), indican que los metabolitos podrían estar interactuando de forma alostérica con la enzima en los sitios de unión C1 y C2, promoviendo de esta manera su activación. Además, la potente actividad anti-CaM de las malbranqueamidas ya bien establecida permite proponer que su modo de acción vasorrelajante podría implicar también una interferencia con la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC).

Abstract

The present work was conducted with the aim of discovering new CaM ligands useful for the development of new drugs and/or research tools, derived from the chemical investigation of the fungal species *Purpureocillium lilacinum* and *Isaria fumosorosea*.

Bioassay guided fractionation of an extract prepared from the culture medium and mycelium of *Purpureocillium lilacinum* allowed the isolation of two CaM inhibitors, namely acremonidin A (**121**) and acremoxanthone C (**122**). The absolute configuration at the stereocenters of **122** was established as 2*R*, 3*R*, 1'*S*, 11'*S*, and 14'*R* through extensive NMR spectroscopy and molecular modeling calculations at the DFT B3LYP/DGDZVP level which included the comparison between theoretical and experimental specific rotation, $^3J_{C,H}$ and $^3J_{H,H}$ values. Compounds **121** and **122** bind to the human calmodulin (*hCaM*) biosensor *hCaMM124C-mBBr*, with dissociation constants (K_d) of 18.25 and 19.40 nM, respectively, seventy fold higher than that of chlorpromazine, used as positive control. Docking analysis predicted that **121** and **122** bind to CaM in a similar site as KAR-2 does, which is unusual. Furthermore, a novel, sensible and specific fluorescent biosensor of *hCaM*, *i.e.* *hCaM T110C-mBBr*, was constructed; this device is labeled in a site where classical inhibitors do not interact and was successfully applied to measure the interaction of **122** to CaM. This is the first report of xanthone-anthraquinone heterodimers in species of *Paecilomyces* or *Purpureocillium* genera.

Chemical investigation of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* yielded seven cyclotetradepsipeptides namely beauverolides L (**112**), C (**113**), F (**114**), I (**115**), J_a (**116**) M (**117**) and N (**118**). The beauverolides were evaluated as potential calmodulin inhibitors using the newly designed CaM biosensor *hCaMM124C-AF₃₅₀*; these peptides displayed high affinity to the proteins with dissociation constants (K_d) ranging from 0.078 μ M to 3.44 μ M. Beauverolide J_a, the only one containing a tryptophan residue in its structure, showed the highest affinity. The docking study predicted that beauverolides could bind to CaM in the same site of interaction as chlorpromazine,

a well-known calmodulina ligand. This investigation represents the first report of anti-CaM activity for cyclotetradepsipeptides.

Additionally, the potential of malbrancheamides (**51** -**53**) as vasorrelaxant agents was investigated in order to determine whether their anti-CaM properties correlated well with a pharmacological activity. The experiment was conducted using rat aorta ring tests and *in silico* studies. Malbrancheamides induced a significant vasorrelaxant activity in a concentration and endothelium-dependent manner in NA (0.1 μ M) pre-contracted aortic rings. Furthermore, malbrancheamide-induced vasorrelaxation was significantly weakened by pretreatment of endothelium-intact aortic rings with L-NAME. Docking analysis predicted that **51** – **53** could interact with eNOS in an allosteric fashion at C1 and C2 pockets promoting its activation. Although other mechanisms could be involved in the endothelium-independent relaxation, the fact that malbrancheamides are well characterized CaM ligands led us to postulate that its mode of action could implicate also an interference of MLC phosphorylation.

2. Antecedentes

2.1 Calmodulina

En organismos superiores, el calcio (Ca^{2+}) actúa como segundo mensajero ubicuo en diversos procesos celulares. Las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} libre ($\sim 10 - 100 \text{ nM}$) están altamente controladas por una combinación de proteínas amortiguadoras, bombas de iones y transportadores (Kovalevskaya *et al.*, 2013). Incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular conllevan a la unión de este ion a proteínas reguladoras intracelulares, un evento que inicia una amplia variedad de procesos celulares (Jurado *et al.*, 1999). El estudio de la red compleja de proteínas de unión a calcio y sus interacciones, ahora denominado como calciómica, trata de entender los efectos del calcio dentro de la fisiología celular (Bertchold *et al.*, 2014). Una de las proteínas reguladoras más importantes de unión a Ca^{2+} intracelular es la calmodulina (CaM).

La calmodulina es la principal proteína de señalización de Ca^{2+} , es ubicua en los organismos eucariotes, altamente conservada y posee un amplio espectro de funciones fisiológicas esenciales. Una de las razones para la diversa gama de funciones de la CaM radica en su habilidad para interactuar con varios cientos de proteínas y modular su actividad de diferentes maneras. Desde su descubrimiento como un activador de la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico (PDE) a principios de los años 70 y nombrada como calmodulina por Cheung (Cheung, 1980), se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de su función en el control de procesos fisiológicos importantes (Berchtold *et al.*, 2014). El conocimiento generado en años recientes acerca de la estructura y funcionalidad de la CaM y sus proteínas blanco, la dinámica de la unión de iones Ca^{2+} y los mecanismos de interacción con sus múltiples proteínas blanco, sean éstos dependientes o no de Ca^{2+} , es sumamente extenso. En los organismos vertebrados, los genes que codifican para la síntesis de CaM son idénticos, hecho que se refleja en el grado de similitud (igual secuencia de aminoácidos) de la proteína presente en distintos organismos.

2.2 Estructura de la Calmodulina

La CaM es una proteína pequeña, formada por 148 aminoácidos, y su estructura consiste de dos dominios globulares, los cuales contienen cada uno, dos sitios de unión a Ca^{2+} tipo mano-EF, ligados por un conector flexible, el cual permite a la proteína el cambiar su conformación según sea necesario. Además de la plasticidad del doblamiento de la proteína, las cadenas laterales de aminoácidos interactúan con proteínas blanco, en particular, los residuos de metionina (Met) son marcadamente flexibles. Dicha plasticidad estructural, tanto a nivel de cadenas individuales laterales como a nivel de orientación de los dominios completos, es crucial para su habilidad de reconocer y regular numerosas proteínas blanco (Villaroel *et al.*, 2014). En células normales, la concentración de *apo*-CaM (aquella que no presenta unión a Ca^{2+}) varía entre 60 y 8800 nM, mientras que la cantidad de *holo*-CaM (complejo formado por cuatro iones Ca^{2+} unidos a CaM) está limitada a ~50 nM (**Figura 1**, Black *et al.*, 2004).

El calcio se une a la CaM, primero en los sitios del dominio C-terminal, que son entonces los de mayor afinidad, y luego a los dos sitios del dominio N-terminal. Sin embargo, en presencia de proteínas blanco, la unión a calcio se vuelve cooperativa para los cuatro sitios, y la afinidad relativa de estos sitios cambia. La concentración de calcio dentro de las células puede variar en un amplio rango (100 – 10, 000 nM), variación que constituye la base de las diferentes cascadas de señalización que se desencadenan en función de la sensibilidad de las distintas proteínas de unión a calcio a las diferencias de concentración del catión. La presencia de la *apo*-CaM es esencial para la supervivencia de las células, y ahora se sabe que algunas enzimas (óxido nítrico sintasa inducible, fosfodiesterasa (PDE), glicógeno fosforilasa, miosina de vellosidades, y proteínas neuronales) prefieren interactuar con esta forma de la CaM (Menyhárd *et al.*, 2009).

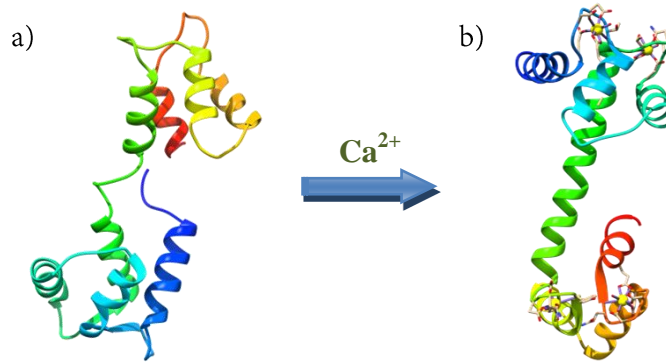


Figura 1. Conformaciones adoptadas por la proteína CaM: a) *apo*-CaM (pdb 1CFD) y b) *holo*-CaM (CaM-Ca²⁺, pdb 1CLL). Los iones calcio están representados por esferas amarillas.

Cuando la calmodulina interactúa con Ca²⁺ (se unen hasta cuatro átomos) hay un cambio en la estructura global de la proteína, de una forma elipsoide globular a una forma de mancuerna, promoviendo también cambios característicos entre los dominios terminales. Estos cambios causan que parches hidrofóbicos sean expuestos entre ambos dominios; esta conformación altamente activa se denomina “forma abierta”. Los parches hidrofóbicos de CaM están rodeados por aminoácidos cargados negativamente, por lo que los estados activados por Ca²⁺ atraerán preferentemente ligantes de naturaleza hidrofóbica y/o polarizados positivamente (Kovalevskaya *et al.*, 2013).

La calmodulina presenta también cadenas laterales con metioninas (Met) en gran abundancia, representando cerca de la mitad de la superficie hidrofóbica de cada parche. Se ha demostrado que estos residuos de aminoácido (Met) se exponen al disolvente en la conformación abierta de CaM, siendo esenciales para la capacidad de la proteína de aceptar una amplia variedad de ligantes (**Figura 2**).

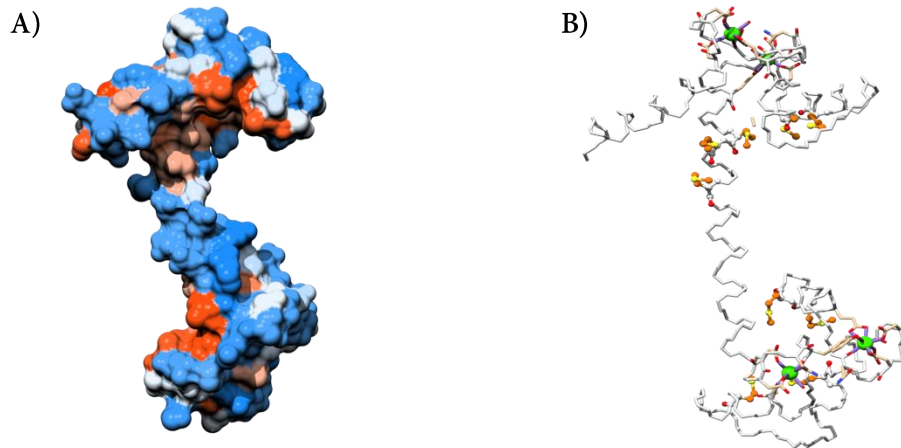


Figura 2. A) Distribución de aminoácidos hidrofóbicos (superficie blanca y roja) y polares (superficie azul) en la conformación *holo*-CaM (pdb 1CCL). B) Localización de las metioninas (bastones y esferas naranjas) en las cadenas laterales y parche hidrofóbico de la conformación abierta de CaM (pdb 1CCL).

Las cadenas laterales son altamente flexibles y son ideales para crear interacciones favorables de tipo van der Waals debido a la polarizabilidad de los grupos sulfuro, al mismo tiempo que son compatibles con el medio acuoso circundante. El complejo Ca^{2+} -CaM, por consiguiente, posee superficies de unión flexibles, dinámicas y altamente hidrofóbicas en cada uno de los dominios (Menyhárd *et al.*, 2009).

2.3 Blancos moleculares regulados por la CaM

La CaM carece de actividad enzimática propia, sin embargo actúa como mediadora en el proceso de señalización por Ca^{2+} de muchas enzimas y canales iónicos presentes en las células. Se estima que la CaM puede interactuar con cerca de 100 diferentes enzimas para así regular numerosas funciones celulares tales como motilidad celular, arquitectura y función del citoesqueleto, proliferación celular, apoptosis, autofagia, homeostasis metabólica, recambio de fosfolípidos, plegamiento proteico, fosforilación/desfosforilación de proteínas, transporte de iones, control osmótico, procesos reproductivos, contracción de músculo y expresión de genes, entre otras (Figura 3, Chin y Means 2000; Reddy *et al.*, 2011). Las interacciones a nivel celular que

presenta la CaM con sus proteínas blanco, pueden traducirse en procesos fisiológicos vitales que incluyen inflamación, memoria a corto plazo, penetración viral, respuesta inmune y el ciclo celular, implicando a la CaM en enfermedades como el SIDA, Alzheimer, y algunos tipos de cáncer, entre otros. Estas proteínas moduladas por CaM comprenden un grupo diverso, relacionadas entre sí por el simple hecho de que interactúan con la calmodulina, una interacción que es regulada por niveles intracelulares de calcio. Con base en sus requerimientos del ion calcio se pueden dividir en tres categorías: aquellas que son dependientes de Ca^{2+} , incluyendo la calcineurina (CNA), la óxido nítrico sintasa (NOS), adenilato ciclasa y la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK), localizadas principalmente en el citosol y citoesqueleto; aquellas que son independientes de Ca^{2+} , entre las que destacan las MLCK tipo II, las neuromodulinas y las neurograninas y, por último, aquellas proteínas que son inhibidas por Ca^{2+} , de las cuáles se tiene poco conocimiento (O'Day 2003).

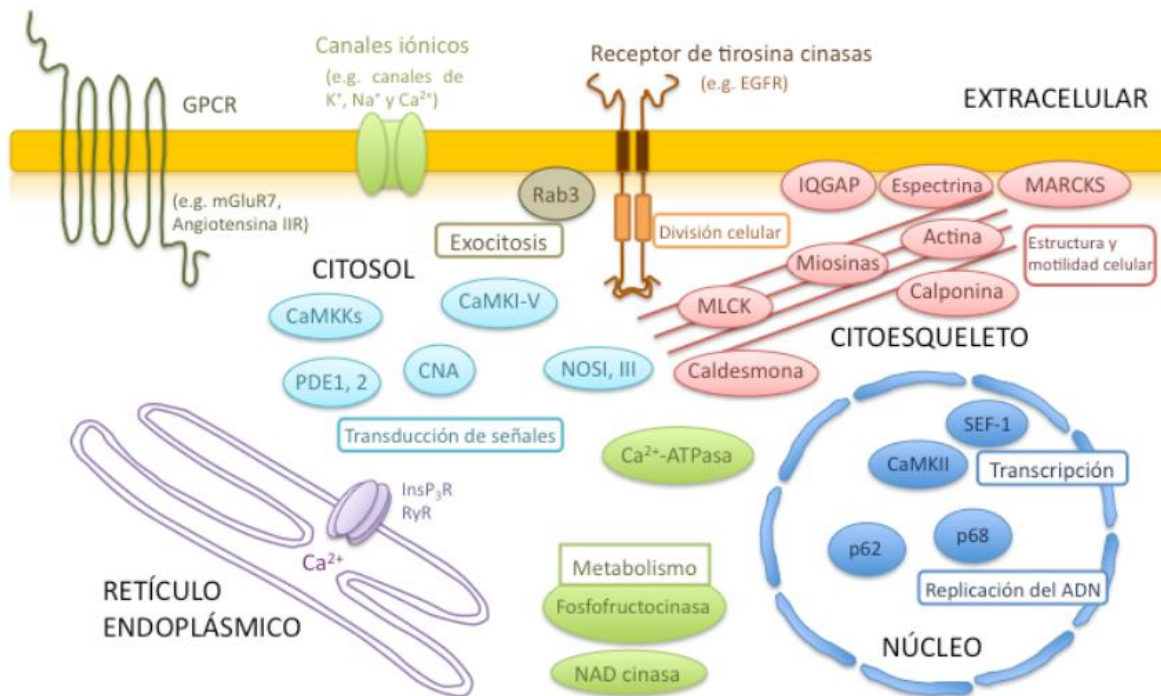


Figura 3. Localización y función de las principales proteínas de unión a calmodulina.

Los dominios de unión a calmodulina de las diferentes proteínas blanco son altamente diversos en su secuencia de aminoácidos. Una de las características en común que denota la interacción de CaM y proteínas blanco es la capacidad que tienen los péptidos de unión en las enzimas blanco para formar hélices anfifílicas cuando se forman complejos con Ca^{2+} -CaM. En el Banco de Proteínas (PDB) se encuentra una cantidad significativa de estructuras tridimensionales de complejos Ca^{2+} -CaM con péptidos de proteínas blanco resueltas (**Figura 4**). En la mayoría de ellas, los dos dominios de CaM rodean el péptido, poniendo en contacto residuos hidrofóbicos en el sitio de unión entre ellos.

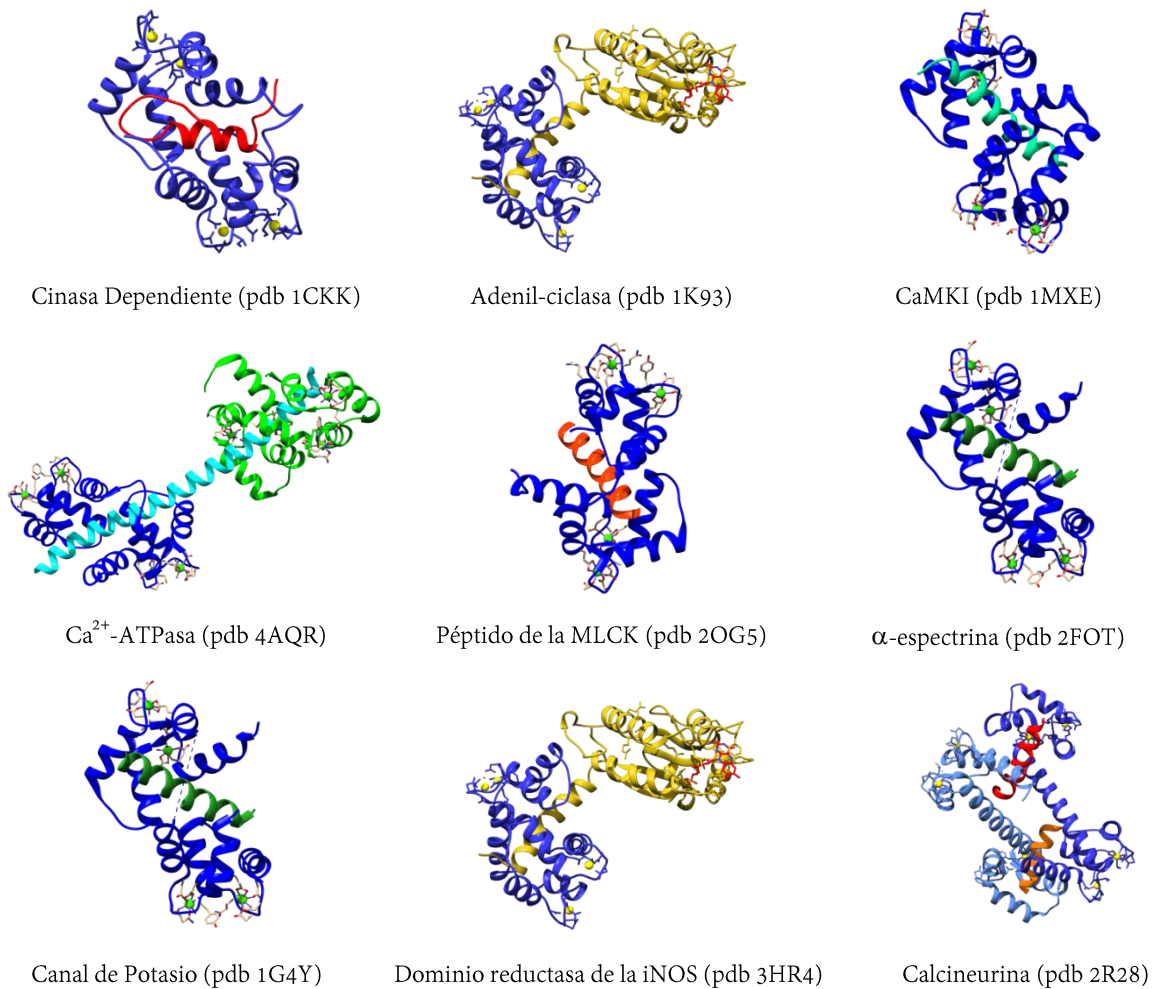


Figura 4. Estructura de complejos formados entre Ca^{2+} -CaM (listones azul marino) y, algunos péptidos de enzimas blanco. Figuras preparadas con Chimera 1.8.1.

2.4 La calmodulina como herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos

En años recientes, la investigación en diferentes grupos de trabajo ha denotado gran interés en el descubrimiento de nuevos inhibidores de la CaM; posiblemente, como una consecuencia del mayor conocimiento de esta proteína, incluyendo aspectos estructurales, el descubrimiento de nuevas enzimas blanco e isoformas y la participación de la proteína en diversos procesos patológicos. Todo ello, hace de la CaM un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos que puedan afectar selectivamente la activación de las enzimas dependientes de esta importante proteína.

Los inhibidores de la CaM pueden actuar en diferentes formas, ya sea uniéndose directamente a la proteína, o bien al complejo CaM-enzima. Para descubrir nuevos inhibidores de CaM se utilizan diferentes estrategias o métodos, la mayoría de ellos *in vitro*. Algunos de los métodos más utilizados para este fin se resumen en la Tabla 1.

De los métodos mencionados en la Tabla 1, aquellos basados en fluorescencia son altamente específicos, de bajo costo, selectivos y con tiempos de reacción relativamente rápidos, aunque algunas veces la preparación del elemento sensible puede ser laboriosa. Entre los métodos basados en fluorescencia, el uso de la CaM marcada con fluoróforos en uno o más sitios específicos ha ganado gran popularidad. Uno de los procedimientos más usados incluye la unión covalente a la CaM de un fluoróforo tiol-reactivo estratégicamente localizado a través de un proceso de mutagénesis de cisteína sitio-dirigida. De esta manera, es posible correlacionar los cambios conformacionales con la unión de ligandos por el cambio en las propiedades de emisión de las proteínas marcadas.

Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM.

Método	Descripción	Referencias
Cromatografía de afinidad	Es un método específico, sin embargo es de alto costo y laborioso.	Yurimoto <i>et al.</i> , 2009
Electroforesis nativa en gel	Sigue el cambio en la movilidad electroforética del complejo CaM-ligando. Es una buena herramienta para detectar eventos de unión. Es cualitativa, relativamente simple, pero poco robusta.	Charpentreau <i>et al.</i> , 2004
Resonancia Magnética Nuclear	Los métodos de RMN multidimensional heteronuclear proveen información estructural detallada sobre las interacciones proteína-ligando en solución. En estos procedimientos, la CaM marcada con ^{15}N y ^{13}C es titulada con los ligandos. También es posible determinar el sitio de unión y conformaciones de los ligandos, receptores y complejos, con la ayuda de experimentos de RMN como NOESY y HSQC.	Chou <i>et al.</i> , 2000; Lalor <i>et al.</i> , 2003
Espectroscopía diferencial UV-DC	La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) en longitud de onda cercana al UV es considerada uno de los métodos más sensibles para seguir pequeños cambios en la conformación de la proteína inducida por unión de ligandos en solución. Una de las desventajas, es la gran cantidad de proteína requerida, así como la necesidad de sistemas acuosos para la medición, ya que absorben en el mismo rango en donde las características estructurales exhiben absorción diferencial de la luz polarizada circularmente.	Masino <i>et al.</i> , 2000; Horvath <i>et al.</i> , 2005
Fluorescencia intrínseca	La CaM contiene dos residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina) que contribuyen a su fluorescencia intrínseca. Ésta requiere poca cantidad de material (proteína y ligando). La respuesta es muy sensible a cambios locales estructurales promovidos por la unión del ligando. Las principales ventajas experimentales son: alto rango de concentración, tiempos de medición rápidos y diferentes configuraciones del equipo instrumental.	VanScyoc y Shea, 2001
Resonancia de Fluorescencia de Transferencia de Energía (FRET)	Esta técnica registra la distancia entre diferentes sondas fluorescentes que se unen a CaM. Involucra la transferencia de energía de un estado excitado del donador al estado excitado del aceptor. Monitorea tanto las interacciones de unión entre diferentes moléculas, como los cambios conformacionales en la misma molécula. Es usada tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . Es un método poderoso y sensible para investigar distancias moleculares y cambios conformacionales en complejos CaM-ligando.	Allen <i>et al.</i> , 2004, Gangopadhyay <i>et al.</i> , 2004

Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM (continuación).

Método	Descripción	Referencias
Difracción de Rayos X	La cristalografía de Rayos X es un método poderoso para estudiar las estructuras de las proteínas y sus ligandos. Esta técnica provee detalles de aproximación atómica de los complejos proteína-ligando y ofrece una vista detallada de su arreglo espacial y sus interacciones. Las principales limitantes de este método son las muestras de proteína cristalina apropiadas.	Babu <i>et al.</i> , 1985; Babu <i>et al.</i> , 1988; Okubo y Okada 1998; Vertessy <i>et al.</i> , 1998; Acharya y Lloyd 2005
Métodos enzimáticos funcionales	Los métodos enzimáticos funcionales miden la inhibición de la actividad enzimática modulada por la CaM, siendo la Fosfodiesterasa del AMPc dependiente de CaM, la más utilizada. La MLCK, la Ca ²⁺ -ATPasa y la calcineurina, son otras enzimas reguladas por CaM empleadas para detectar antagonistas de la CaM.	Sharma y Wang 1979; Chock y Huang 1984; Harmon <i>et al.</i> , 1984; Mata <i>et al.</i> , 2003
Métodos computacionales	Los métodos computacionales son usados para la caracterización de sitios de unión de proteínas efectoras, especialmente ahora que la información estructural sobre proteínas está disponible en bancos de datos (PDB). En el diseño de fármacos en general, las estrategias de modelado para optimizar la afinidad de unión receptor-ligante están principalmente enfocadas en la detección del sitio funcional, esto es, en localizar los sitios de unión de una superficie en la proteína, seguido de la consideración de la similitud del sitio funcional, y su validación, a través de acoplamiento molecular (<i>docking</i>).	Gabdoulline y Wade 2002, Ladbury y Williams 2004
Biosensores de fluorescencia	Se basa en el uso de biomoléculas que transducen eventos de unión en señales fluorescentes detectables y que recientemente demostraron ser herramientas útiles para detectar inhibidores de la CaM.	Allen <i>et al.</i> , 2004, Gonzalez-Andrade <i>et al.</i> , 2009

Recientemente, González-Andrade y colaboradores (2009) diseñaron una proteína humana recombinante marcada con un fluoróforo, la calmodulina *hCaMM124C-mBBr*, útil para la identificación de inhibidores de la CaM. Esto se llevó a cabo reemplazando la Met124 por cisteína, mediante mutagénesis sitio-dirigida; la proteína resultante, *hCaMM124C*, se purificó, y posteriormente, se le unió covalentemente el fluoróforo monobromobimano (*mBBr*) en la posición correspondiente a la Cys124 de la nueva proteína (**Figura 5**).

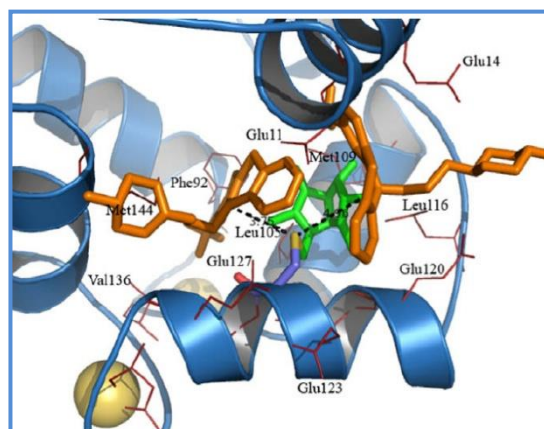


Figura 5. Modelo in silico de la mutación del residuo de cisteína y la unión del bimanio. Las líneas rojas muestran los residuos de aminoácidos del sitio de unión en el complejo CaM-TFP, en verde se muestra el *mBBr*, en naranja a la TFP y las esferas amarillas muestran los iones de calcio (Tomado de González-Andrade, *et al.*, 2009).

Este biosensor fue utilizado exitosamente para medir las propiedades anti-CaM de la clorpromazina, un inhibidor clásico de la CaM, y de algunos productos naturales (Figuerola *et al.*, 2011; González-Andrade *et al.*, 2011) que previamente habían demostrado propiedades inhibitorias en un ensayo funcional utilizando el complejo CaM-PDE1 como sistema experimental. Los resultados demostraron que los compuestos que inhibían la actividad enzimática de la PDE1 mostraban una excelente afinidad a la proteína marcada, apagando su fluorescencia de manera significativa y dependiente de la concentración. Estos resultados permitieron validar el uso de la *hCaM M124C-mBBr* como una herramienta analítica, robusta y sensible para la búsqueda de fármacos potenciales con un efecto sobre la CaM.

El avance en los métodos de detección más sensibles y específicos de inhibidores de la CaM hizo que el descubrimiento de moléculas (de origen sintético y natural) con actividad anti-CaM incrementara considerablemente. Este hecho no sólo tuvo impacto en la investigación de esta proteína, sino que atrajo la atención de empresas farmacéuticas con miras de desarrollar nuevos medicamentos.

En la década de los años 90, la industria farmacéutica invirtió de manera considerable en el desarrollo de moléculas capaces de inhibir las propiedades de la calmodulina; en este período se generaron alrededor de 30 patentes en donde se describieron compuestos antagonistas de la CaM con posible uso terapéutico para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares y neurológicos, incluyendo hipertensión, angina de pecho, infarto y otras enfermedades cerebrovasculares (Menyhárd *et al.*, 2009). De acuerdo a registros en el Banco de Datos de Fármacos (DrugBank, www.drugbank.ca), existen alrededor de 18 moléculas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) que tienen como probable mecanismo de acción la interacción con la CaM y/o unión a enzimas blanco. Existen además, otras en fase experimental y otros compuestos que fueron aceptados pero han sido retirados del mercado (Tabla 2).

Los fármacos que inhiben la función de la CaM de manera directa o indirecta, han sido ampliamente usados para el control de la esquizofrenia (trifluoperazina, TFP, **1**) y como agentes anticancerígenos para el tratamiento de cáncer de mama (*e.g.* tamoxifen, y análogos). Un entendimiento total de la regulación de las proteínas blanco de CaM es esencial si se espera desarrollar nuevos fármacos relacionados con estos procesos.

Tabla 2. Moléculas con actividad anti-CaM empleadas como fármacos o como herramientas de investigación.

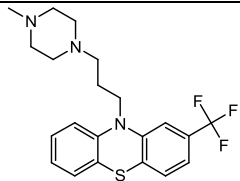
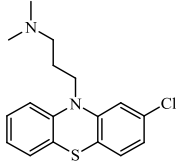
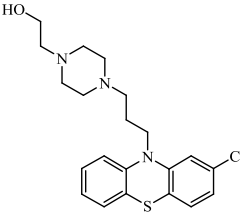
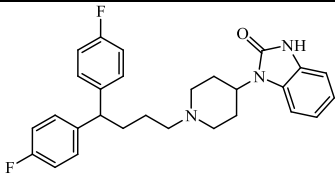
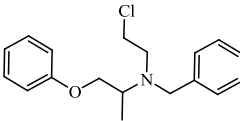
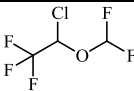
Molécula (Nombre Comercial)	Estructura	Estatus Clínico	Actividad Farmacológica	Referencia
Trifluoperazina (1) (Terfluzin)		Aprobado	Fenotiazina; agente antisicótico; antagonista de dopamina	Bar Sagi <i>et al.</i> , 1983; Vandoselaar <i>et al.</i> , 1994
Clorpromazina (2) (Thorazine)		Aprobado	Fenotiazina; agente antisicótico	Marshak <i>et al.</i> , 1985
Perfenazina (3) (Decentan)		Aprobado	Fenotiazina, agente antisicótico, antagonista dopaminérgico	Natochin <i>et al.</i> , 1987
Pimozida (4) (Neoperidole)		Aprobado	Agente antisicótico, antagonista de dopamina	Strobl <i>et al.</i> , 1990 Cimino <i>et al.</i> , 1988
Fenoxibenzamina (5) (Dibenzyline)		Aprobado	Agente antihipertensivo, vasodilatador, antagonista alfa-adrenérgico	Mongin <i>et al.</i> , 1999 Edlin <i>et al.</i> , 2002
Isoflurano (6) (Forane)		Aprobado	Anestésico (inhalación)	Bickelr <i>et al.</i> , 2005

Tabla 2. Moléculas con actividad anti-CaM empleadas como fármacos o como herramientas de investigación (continuación).

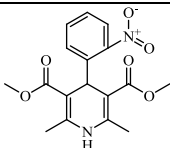
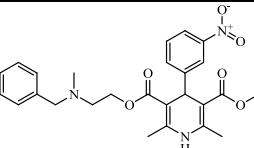
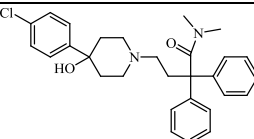
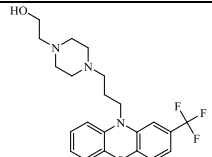
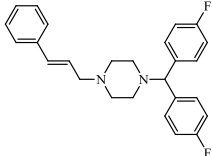
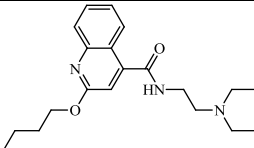
Molécula (Nombre Comercial)	Estructura	Estatus Clínico	Actividad Farmacológica	Referencia
Nifedipino (7) (Adalat)		Aprobado	Dihidropiridina, agente antihipertensivo	Lamers <i>et al.</i> , 1985
Nicardipino (8) (Cardene)		Aprobado	Dihidropiridina, agente antihipertensivo, antiarrítmico, vasodilatador, bloqueador de canales de calcio	Thayer <i>et al.</i> , 1983
Loperamida (9) (Imodium)		Aprobado	Agente antidiarréico	Stoll <i>et al.</i> , 1988 Daly <i>et al.</i> , 2000
Flufenazina (10) (Anatensol)		Aprobado	Fenotiazina, agente antisicótico, antagonista de dopamina	Mongin <i>et al.</i> , 1999
Flunarizina (11) (Fluxarten)		Aprobado	Aticconvulsivo, vasodilatador, bloqueador de canales de calcio	Imming <i>et al.</i> , 2006
Cinchocaina (12) (Cincaina)		Aprobado	Anestésico local	Muto <i>et al.</i> , 1983

Tabla 2. Moléculas con actividad anti-CaM empleadas como fármacos o como herramientas de investigación (continuación).

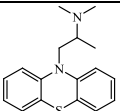
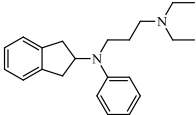
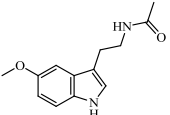
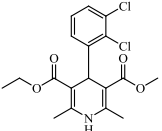
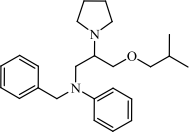
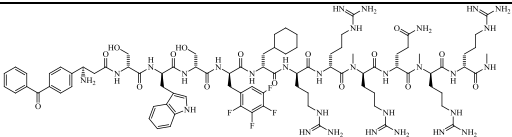
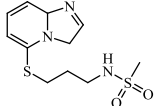
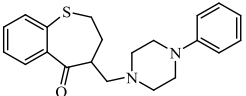
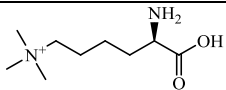
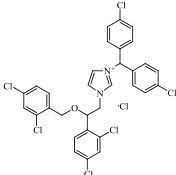
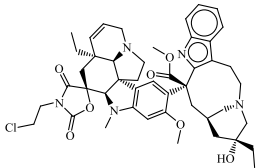
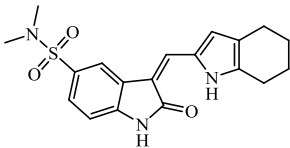
Molécula (Nombre Comercial)	Estructura	Estatus Clínico	Actividad Farmacológica	Referencia
Prometazina (13) (Avomine)		Aprobado	Antialérgico, antiprurítico, antagonista de histamina H1	Cohen <i>et al.</i> , 1986
Aprindina (14) (Fibocil)		Aprobado	Agente antiarrítmico, bloqueador de canales de sodio voltaje-dependientes	Levine <i>et al.</i> , 1983
Melatonin (15) (Mela-T)		Aprobado, nutracéutico	Antioxidante, depresor del sistema nervioso central	Del Río <i>et al.</i> , 2004
Felodipina (16) (Plendil)		Aprobado, bajo investigación	Agente antihipertensivo, antiarrítmico, vasodilatador, bloqueador de canales de calcio	Bostrom <i>et al.</i> , 1988
Bepidil (17) (Angopril)		Aprobado, retirado	Agente antihipertensivo, antiarrítmico, vasodilatador, bloqueador de canales de calcio	Lamers <i>et al.</i> , 1985
CBP501 (18)		Pruebas Clínicas Fase II	Antineoplásico	Saphiro <i>et al.</i> , 2011
Imidazopiridina (19)		Pruebas Clínicas	Antagonista de CaM	Takatani 1992
Tetrahidrobenzotiepina (20)		Pruebas Clínicas	Antagonista de CaM	Tanabe <i>et al.</i> , 1991

Tabla 2. Moléculas con actividad anti-CaM empleadas como fármacos o como herramientas de investigación (continuación).

Molécula (Nombre Comercial)	Estructura	Estatus Clínico	Actividad Farmacológica	Referencia
N-trimetilisina (21)		Fase experimental	Mitógeno	Overington <i>et al.</i> , 2006
Calmidzaolio (22)		Fase Experimental	Agente antihipertensivo Agente vasorrelajante	Sunagawa <i>et al.</i> , 2000
3'-(β-cloroetil)-2',4'- dioxo-3, 5'- <i>spiro</i> - oxazolidino-4- desacetoxi-vinblastina (KAR-2) (23)		Fase experimental	Agente antimitótico	Hórvath <i>et al.</i> , 2005
(3Z)-N,N-dimetil-2-oxo- 3-(4,5,6,7-tetrahidro-1H- indol-2-ilmetiliden)-2,3- dihidro-1H-indol-5- sulfonamida (24)		Fase experimental	Inhibidor de cinasas	Blake <i>et al.</i> , 2000

Muchas de las moléculas que interaccionan con la CaM (fenotiazinas, arilalquilamidas, naftalensulfonamidas, calmidazolio, etc.) se usan ampliamente como herramientas de investigación para el estudio de las funciones fisiológicas de esta importante proteína. La mayoría de estos compuestos manifiestan su actividad anti-CaM mediante la competencia con la proteína blanco por la unión a calmodulina, tal es el caso de la trifluoperazina (**1**), la cuál ha sido ampliamente utilizada como un control positivo y denominado como inhibidor clásico; los sitios de unión en la CaM así como la afinidad de unión han sido bien caracterizadas. Salvo algunas excepciones como algunos derivados de naftalensulfonamidas, o arilalquilaminas, los ligantes a CaM poseen una afinidad mucho mayor que la de algunos péptidos como el CBP501 (**18**) cuya constante de disociación se encuentra en el rango nanomolar (Orosz *et al.*, 2006).

2.5 Productos de origen natural con actividad anti-CaM

Un número importante de productos naturales obtenidos de animales, plantas y microorganismos han sido reportadas como ligantes de la CaM de acuerdo a revisiones recientes (Martínez-Luis *et al.*, 2007). Estos productos presentan una gran diversidad estructural y pertenecen a diferentes categorías de metabolitos secundarios, incluyendo alcaloides, terpenoides, cumarinas, antracilinas, antraquinonas, lignanos, estilbenoides, así como flavonoides y otros compuestos fenólicos.

De organismos del reino animal destaca la stellettamida A (**25**, **Figura 6**), una octahidroindolizina con un residuo farnesilo, aislada de una esponja marina del género *Stelletta*; el producto inhibió la actividad de dos enzimas dependientes del complejo Ca^{2+} -CaM, la $(\text{Ca}^{2+}$ -CaM)-ATPasa obtenida de membrana de eritrocito ($\text{CI}_{50} = 100 \mu\text{M}$) y la PDE1 a partir de músculo cardiaco de bovino ($\text{CI}_{50} = 52 \mu\text{M}$). La interacción entre **25** y la CaM también se demostró mediante un ensayo de apagamiento de la fluorescencia intrínseca (3 – 300 μM). Además, **25** inhibió la fosforilación de la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK) con una $\text{CI}_{50} = 152 \mu\text{M}$

en un ensayo de contracción de músculo liso conteniendo CaM, MLC y MLCK (Abe *et al.*, 1997). El stelellattazol A (**26**), obtenido de la misma esponja, también inhibió en un 45% la actividad de la PDE1 a concentraciones de 100 μM (Tsukamoto *et al.*, 1999). De la esponja marina *Theonella* sp. se aisló la konbamida (**27**), un alcaloide peptídico que inhibió de forma moderada ($\text{CI}_{50} = 100$ μM) la actividad de la PDE1 (Kobayashi *et al.*, 1991). Las estructuras de estos metabolitos se muestran en la **Figura 6**.

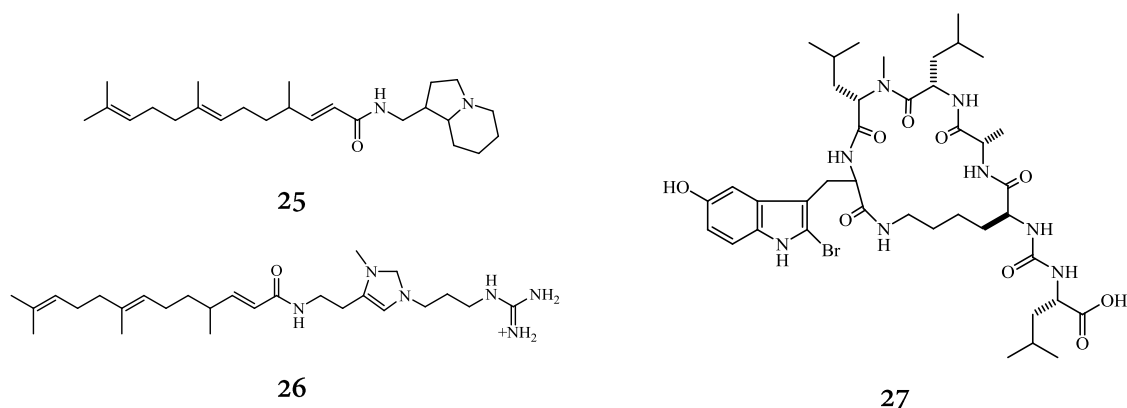


Figura 6. Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de fuentes animales.

El reino vegetal ha aportado un gran número de compuestos ligantes de la calmodulina (**Figura 7**). Entre los más estudiados y reconocidos, tal vez se encuentren los alcaloides vinblastina (**28**) y la vincristina (**29**), aislados de *Catharanthus roseus* (Orosz *et al.*, 2006). Estos dos metabolitos vegetales se unen a la CaM en una forma dependiente de Ca^{2+} . La interacción fue cuantificada por las técnicas de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) y dicroísmo circular. La constante de disociación (3 μM) del complejo CaM-vinblastina reveló que la afinidad de unión del alcaloide hacia la CaM es comparable a su afinidad por la tubulina (Molnar *et al.*, 1995). Los monómeros catarantina y vindolina son mucho menos efectivos como inhibidores de la polimerización de la tubulina en microtúbulos que la vinblastina y la vincristina. La papaverina (**30**), una isoquinolina aislada de la especie medicinal *Papaver somniferum*, inhibe a la PDE1 y reduce marcadamente la actividad de la isoforma PDE10, la cual es también sensible a la CaM (Boswell-Smith *et al.*, 2006). De la especie *Menispermum dauricum* y *Berberis poirretti*, se aisló la

berbamina (**31**), alcaloide bisbencilisoquinolínico que inhibe la capacidad de la CaM para activar a PDE1 (Hu *et al.*, 1988).

Algunos estilbenoides (**32 – 34**) aislados de distintas especies de orquídeas mexicanas han demostrado tener propiedades inhibitorias sobre la CaM. Estos compuestos aromáticos inhibieron la PDE1 sin afectar la actividad basal de la enzima. Dado que la mayoría de estos compuestos son relajantes de músculo liso, se ha propuesto que la CaM está vinculada a dicho efecto (Hernández-Romero *et. al.* 2004; Reyes-Ramírez *et al.*, 2011).

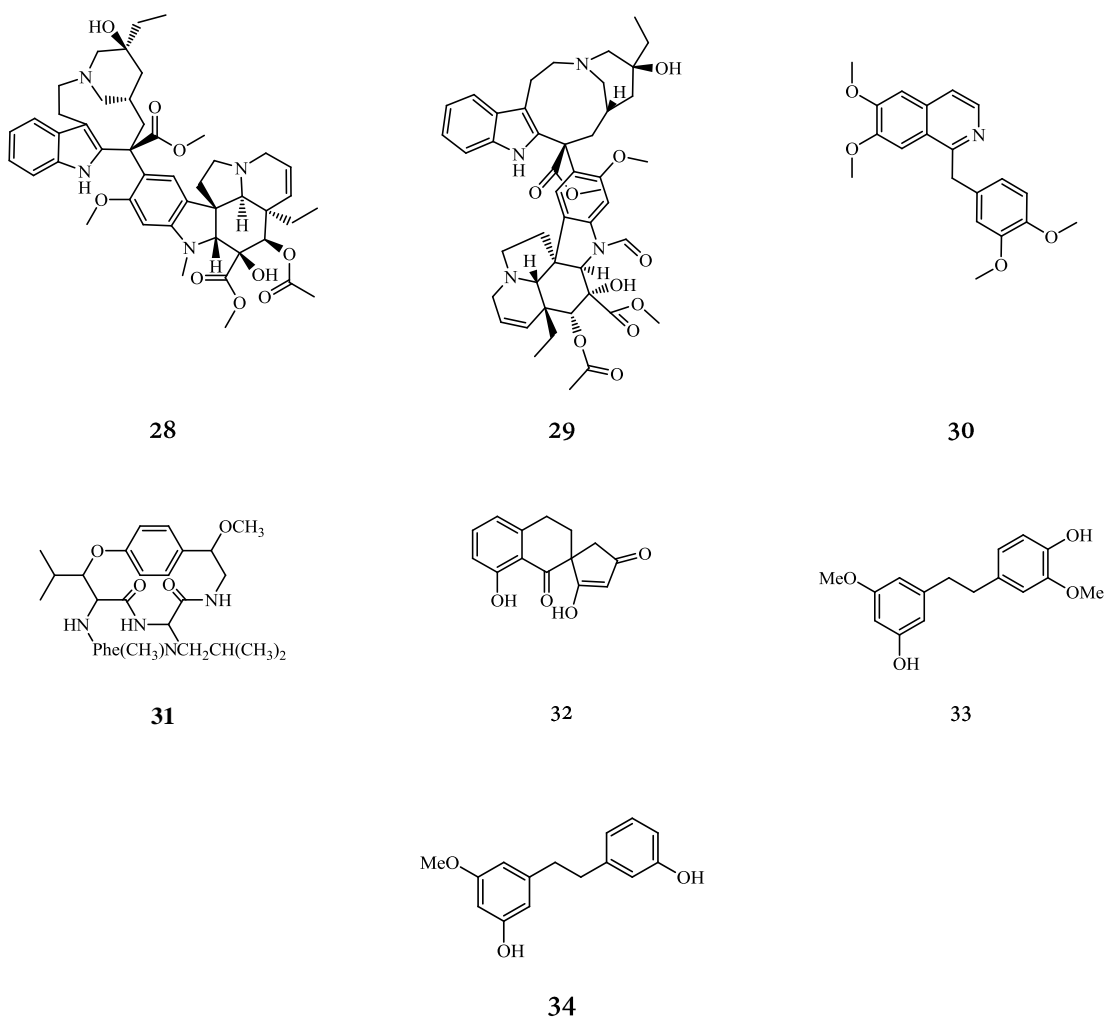


Figura 7. Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de plantas.

Los microorganismos también son fuentes importantes de inhibidores de la CaM (Figura 8). Así, a partir de *Bacillus polymyxa* se aisló la polimixina B (35), un péptido cíclico con propiedades antibióticas ampliamente utilizado como herramienta de investigación en procesos que involucran la proteína cinasa C (PKC). La polimixina B inhibe enzimas dependientes de CaM, tales como la MLCK y la PKII con valores de $K_i = 17 \mu\text{M}$ y $950 \mu\text{M}$, respectivamente (Hegemann *et al.*, 1991). El producto KS-505a (36) aislado de *Streptomyces argenteolus* A-2, es un terpenoide que posee una estructura única con un núcleo de ácido 2-O-metilglucurónico, un esqueleto isoprenoide decacíclico y una γ -hidroxi- γ -lactona aromática. Este metabolito inhibió la actividad enzimática de la PDE1 ($\text{CI}_{50} = 1.4 \mu\text{M}$), y en un ensayo de cinética enzimática se comportó como un inhibidor competitivo de la PDE1 por el complejo Ca^{2+} -CaM con una $K_i = 0.089 \mu\text{M}$ (Nakanishi *et al.*, 1986). La antraciclina adriamicina (37), compuesto anticancerígeno producido por varias especies de *Streptomyces*, inhibe la cinasa dependiente de CaM (CaMK) con una $\text{IC}_{50} = 50\text{-}85 \mu\text{M}$, así como otras funciones de la CaM ($30 - 300 \mu\text{M}$) mediante su unión a un sitio hidrofóbico de la proteína (Matsuda y Kase, 1987).

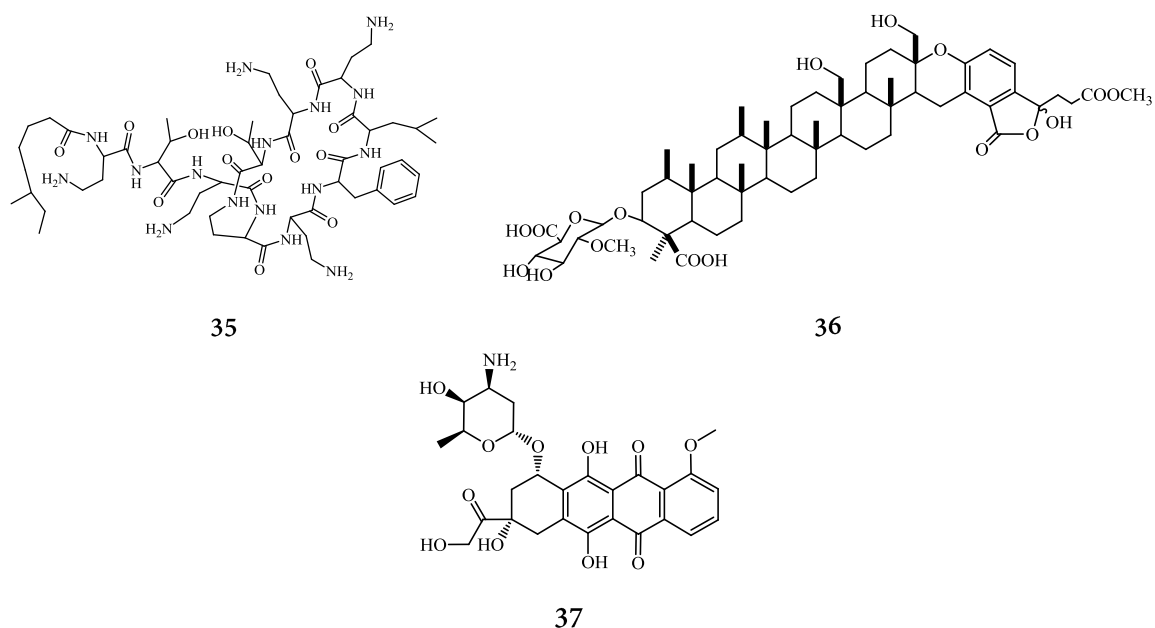


Figura 8. Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de algunos microorganismos.

De diferentes especies de ascomicetos se han aislado importantes metabolitos con actividad anti-CaM significativa (**Figura 9a y 9b**). La ofiobolina A (**38**), aislada del hongo *Bipolaris oryzae*, figura como el inhibidor de CaM de origen natural más estudiado hasta la fecha. Es una potente fitotoxina que inhibe la PDE1 dependiente de CaM con una $CI_{50} = 9 \mu\text{M}$ (Leung *et al.*, 1984). La interacción directa entre **38** y CaM se evaluó mediante diferentes métodos espectroscópicos (fluorescencia intrínseca y UV), revelando que dos moléculas de **38** se unen a la CaM. Además, Evidente y colaboradores demostraron que la ofiobolina A también presenta actividad herbicida (Evidente *et al.*, 2006). El ácido secalónico (**40**) y el verruculógeno (**39**); son toxinas producidas por algunas especies de *Penicillium*, las cuales inhiben la actividad de la PDE1 ($CI_{50} = 42 \mu\text{M}$ y $CI_{50} = 50 \mu\text{M}$, respectivamente) de manera dependiente de la concentración (Pala *et al.*, 1999). Del hongo *Guanomyces polythrix* se obtuvieron una serie de naftopironas fitotóxicas (**41 – 46**), las cuales inhibieron la actividad de la proteína NADK dependiente de CaM, y la actividad de la PDE1, con valores de CI_{50} entre 5.8 a 8.1 μM (Mata *et al.*, 2000; Macías *et al.*, 2001).

A partir del hongo *Mollisa ventosa* se aislaron los metabolitos policlorados denominados como KS-504 (**47 – 50**), los cuales presentaron inhibición sobre diferentes enzimas dependientes de CaM (CaM-PDE de cerebro, MLCK, Ca^{2+} -ATPasa, Proteína Cinasa C), con valores de CI_{50} que varían entre 11 y 207 μM (Nakanishi *et al.*, 1989). En nuestro grupo de trabajo se estudió el hongo *Malbranchea aurantiaca*, una especie coprófila aislada de guano de murciélago en cuevas del estado de Guerrero, México. De este hongo se aislaron cuatro alcaloides indólicos con un biciclo diazaoctano, las malbranqueamidas (**51 – 53**); estos productos presentaron actividad anti-CaM en un ensayo funcional utilizando a la enzima PDE1 como enzima monitora (Martínez-Luis *et al.*, 2005). En estudios posteriores y empleando diversas técnicas espectroscópicas (resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular, fluorescencia extrínseca) así como estudios de acoplamiento molecular, corroboraron de manera directa la interacción de **51 – 53** con la CaM (Figuroa *et al.*, 2011; Madariaga-Mazón A. 2010).

Los derivados de xantona (**54 – 58**) aislados de *Emericella* sp. 25379, una especie fúngica de origen marino, inhibieron de manera significativa la actividad de la CaM empleando a la enzima PDE-1 como enzima monitora, en donde los análogos **55** y **57** presentaron actividad comparable con la de la CPZ, con valores de CI_{50} de 5.54 μ M y 5.62 μ M, respectivamente (Figueroa *et al.*, 2009). Una reinvestigación química de la *Emericella* sp. 25379 empleando un biosensor de CaM doblemente marcado en las posiciones Leu39 y Val91 (*hCaML39C-mBBr/V91C-mBBr*), permitió el aislamiento de tres xantonas adicionales (**59 - 60**). Estos metabolitos demostraron tener propiedades inhibitorias de la CaM con valores de afinidad en el rango de 4 a 498 nM (González-Andrade *et al.*, 2011).

En un estudio reciente del hongo endófito MEXU 26343 aislado de la especie medicinal *Hintonia latiflora* se obtuvo al policétido vermelhotina (**61**). Mediante el empleo del biosensor fluorescente de CaM *hCaMM124C-mBBr* se evidenció la interacción directa de **61** con la proteína, el valor calculado de CI_{50} fue de 0.25 μ M (Leyte-Lugo *et al.*, 2012).

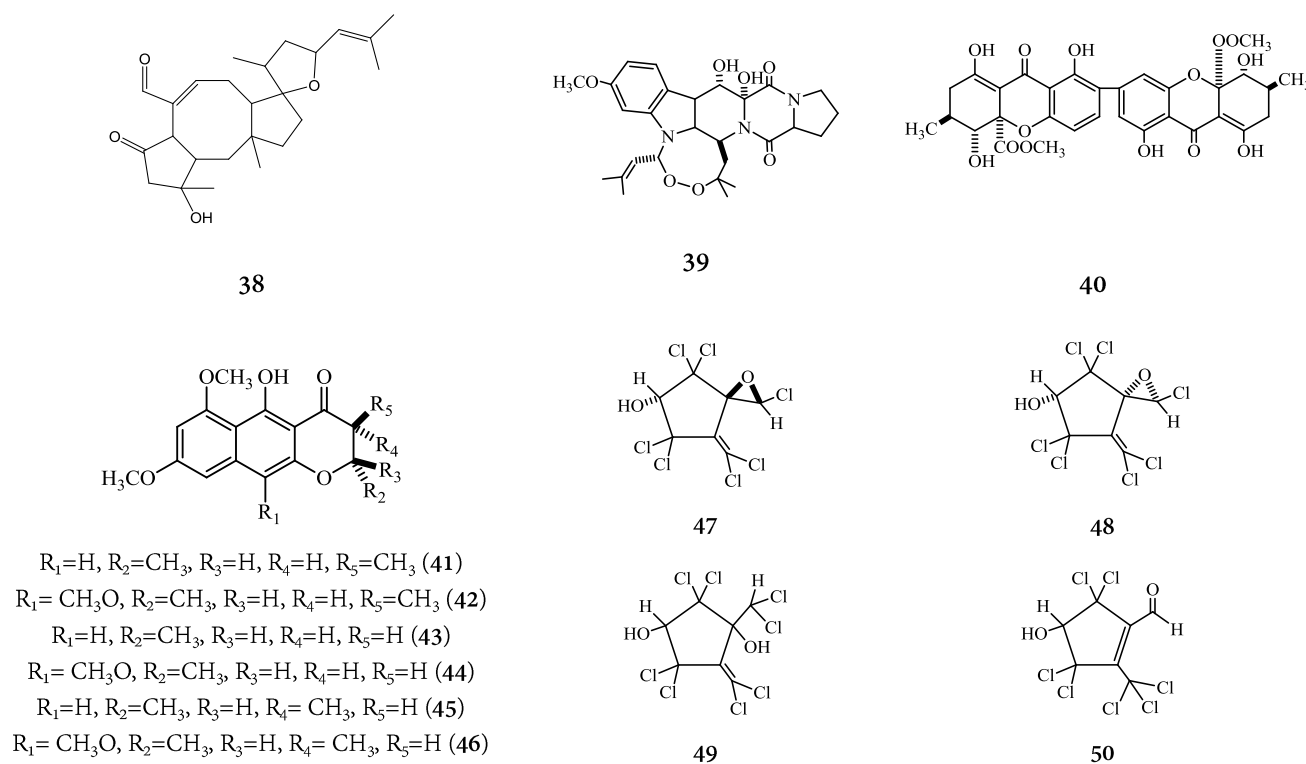


Figura 9a. Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de fuentes fúngicas.

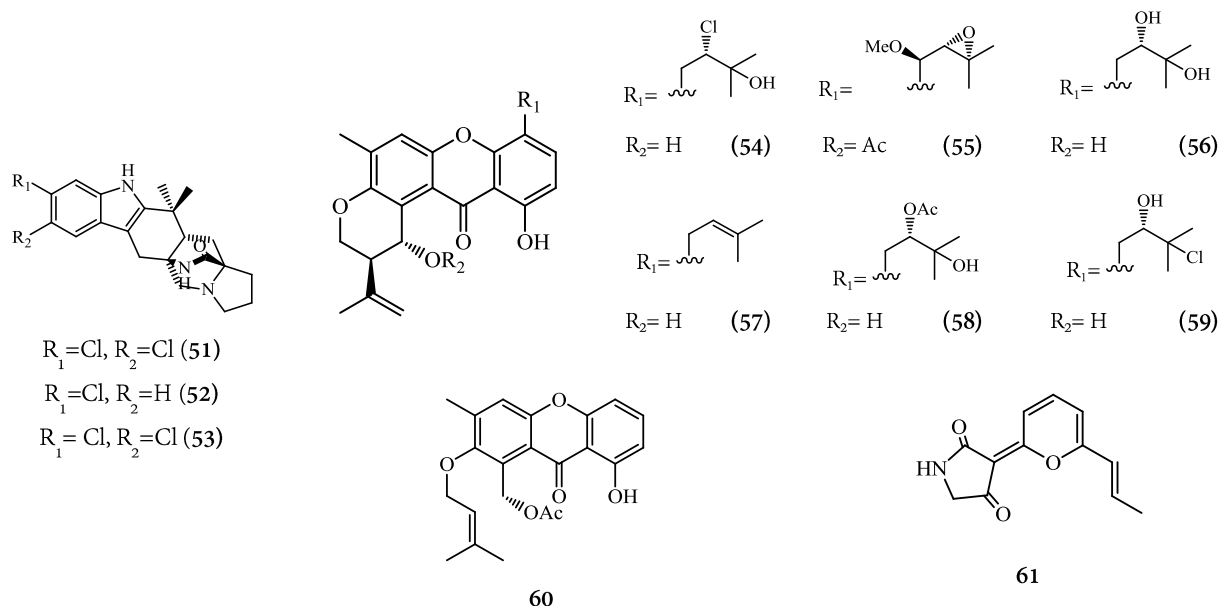


Figura 9b. Metabolitos selectos con actividad anti-CaM aislados de fuentes fúngicas.

2.6 El género *Paecilomyces*

El género *Paecilomyces* fue establecido por Bainier en 1907, revisado por Brown y Smith en 1957 y modificado en 1974 por Samson. *Paecilomyces variotii* fue la primera especie aceptada en el género, que ahora cuenta con más de 100 especies. Las especies de *Paecilomyces* son de tipo filamentoso y se encuentran usualmente en suelos, hojarasca y algunos productos alimenticios (Dong *et al.* 2012). Algunas especies de *Paecilomyces* infectan insectos y a humanos (Van Schooneveld *et al.*, 2008). Las especies más comunes y mejor estudiadas son *Paecilomyces variotii* y *Paecilomyces fumosoroseus* (sinonimia *Isaria fumosorosea*). A partir de *P. variotii* se han aislado importantes enzimas termotolerantes (Michelin *et al.*, 2008), mientras que *P. fumosoroseus* es relevante por su uso para el control de la mosquita blanca (Wright *et al.*, 2000).

Paecilomyces lilacinus (sinonimias *Purpureocillium lilacinum*) es un patógeno emergente que causa algunas infecciones en humanos, aunque también se usa como un importante agente de control biológico en contra de nematodos (Dong *et al.*, 2012).

2.6.1 Metabolitos selectos aislados de especies del género *Paecilomyces*

A partir del hongo endófito *Paecilomyces* sp. aislado de un manglar en la zona sur del mar de China, se aislaron las paeciloxocinas A (**62**) y B (**63**), agentes con citotoxicidad moderada en contra la línea celular hepG2 (Wen *et al.*, 2010). De otro aislamiento de la región de manglares asiáticos, se aislaron las paecilinas A (**64**) y B (**65**), sin embargo ninguno de los productos presentaron citotoxicidad (Guo *et al.*, 2007). De la cepa *Paecilomyces* sp FKI-0550 aislada de una muestra de suelo de Okinawa, Japón, se aisló el paecilaminol (**66**), el cual presentó actividad como inhibidor de la NADH-fumarato reductasa, con un valor de $CI_{50} = 5.1 \mu\text{M}$ (Ui *et al.*, 2006).

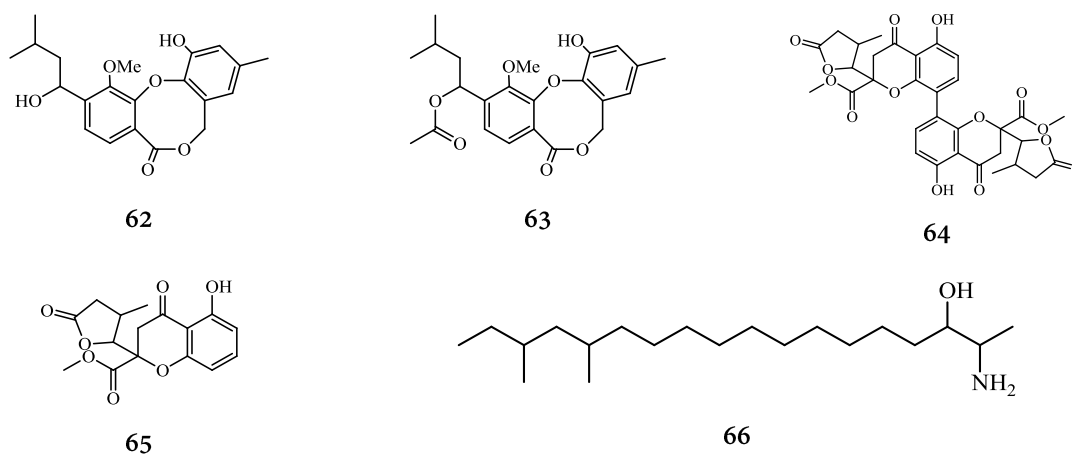


Figura 10. Metabolitos aislados de algunas especies de *Paecilomyces* sp.

La cornexistina A (**67**) se aisló de *P. variotii* SANK 20986, un hongo coprófilo obtenido de heces de venado recolectadas en Canadá; el producto **67** demostró propiedades herbicidas, evitando el crecimiento de diversas monocotiledóneas y dicotiledóneas con rangos de inhibición entre el 80 y 100 %. Además, se demostró su nula toxicidad en un ensayo de toxicidad aguda en ratones, lo que hace de este compuesto un herbicida promisorio para los cultivos de maíz (Nakajima *et al.*, 1991). Del hongo entomopatógeno *P. militaris* se aisló la cordicepina (**68**), un metabolito con potente actividad sobre líneas celulares B16/F10 (melanoma) y HT-29 (cáncer de colon) (Li *et al.*, 2011). De esta misma especie, se reportó el aislamiento de tres nuevos glicósidos

de isoflavona (69 - 71), los cuáles presentaron actividad anti-microbiana moderada (Hu *et al.*, 2009). La militarinona A (72), un alcaloide de piridona, fue aislado mediante un fraccionamiento biodirigido a partir del micelio de *P. militaris*, su efecto sobre células PC-12 denota su actividad como agente neurotrófico (Schmidt *et al.*, 2002).

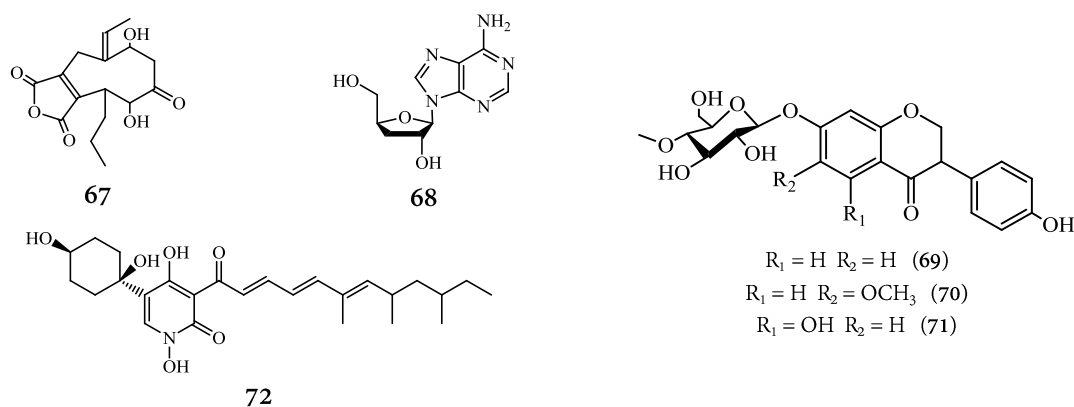


Figura 11. Metabolitos aislados de las especies *P. variotii* y *P. militaris*.

La especie *P. farinosus* pertenece al grupo de entomopatógenos que infectan primordialmente insectos del orden Lepidoptera, Homoptera y Coleoptera. De esta especie fúngica se aisló la (+)-*N*-desoximilitarinona A (73), la cual demostró propiedades similares a las de 72 sobre células PC-12 a concentraciones de 33 y 100 μM (Yongxian Cheng 2006). A partir de una cepa obtenida en Nueva Zelanda, se aisló la paecilosetina (74), un derivado de ácido tetrámico con actividad neurotrófica ($CI_{50} = 3.1 \mu\text{g/mL}$) en la línea celular P388 (Lang *et al.*, 2005). Las farinosonas A - C (75 - 77), aisladas de mariposas infectadas en la República Popular de China indujeron el crecimiento de neuritas en células PC-12 a concentraciones de 50 μM (Cheng *et al.*, 2004) (Figura 12).

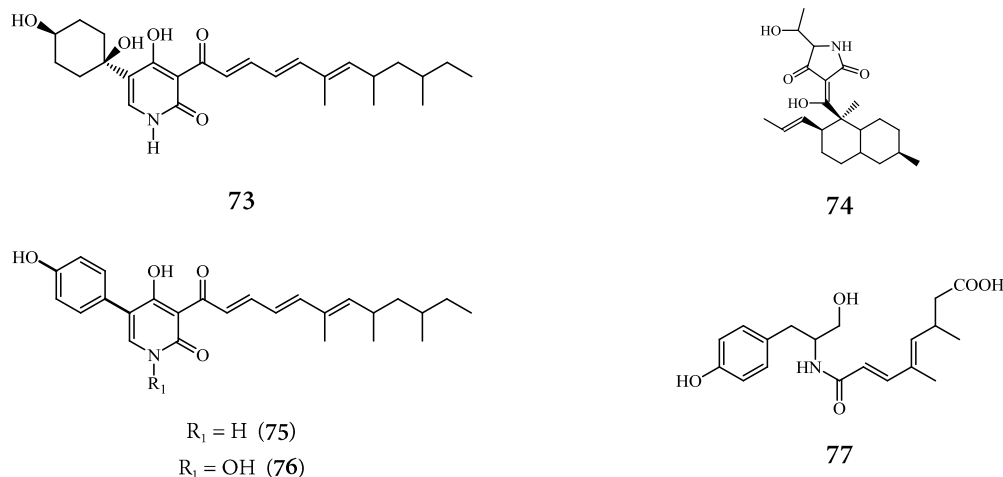


Figura 12. Metabolitos aislados de la especie *P. farinosus*.

Paecilomyces tenuipes (también llamada *Isaria japonica*) es una especie entomopatógena usada en la medicina tradicional (generalmente como tónico y antitusivo) y algunos suplementos alimenticios en China, Corea y Japón. Cuando el hongo infecta al hospedero, el micelio generado crece (desde dentro del cuerpo del insecto) en forma de cuerpos fructíferos (carpóforo), de donde se han aislado gran cantidad de compuestos activos. Tal es el caso de las paecilomicinas A, B y C (78- 80) y las espirotenuipesinas A y B (81 – 82), serie de tricotecanos con potente actividad en la biosíntesis de factor neurotrófico en células gliales (Kikuchi *et al.*, 2004a; Kikuchi *et al.*, 2004b). De un cultivo artificial de carpóforos de *P. tenuipes* se aisló el acetoxiscirpenediol (83) con actividad citotóxica sobre líneas celulares de diversos tipos de cáncer (Nam *et al.*, 2001). Los ciclodepsipéptidos beauvericina (84) y beauvericina A (85), aislados de una cepa originaria de la región sur de Tailandia, presentaron actividad antimicrobiana y antiplasmódica (Nilanonta *et al.*, 2000). Las estructuras de los metabolitos aislados de *P. tenuipes* se muestran en la Figura 13a y 13b.

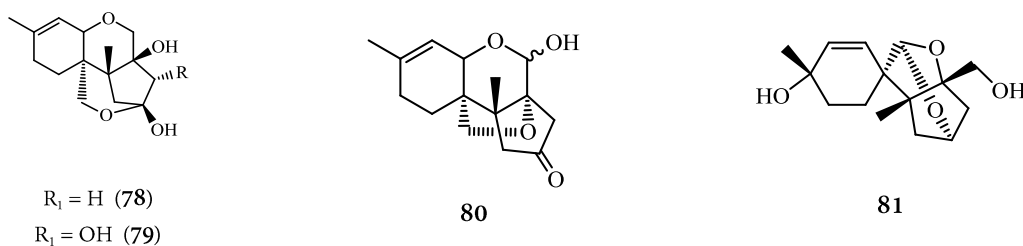


Figura 13a. Metabolitos aislados de la especie *P. tenuipes*.

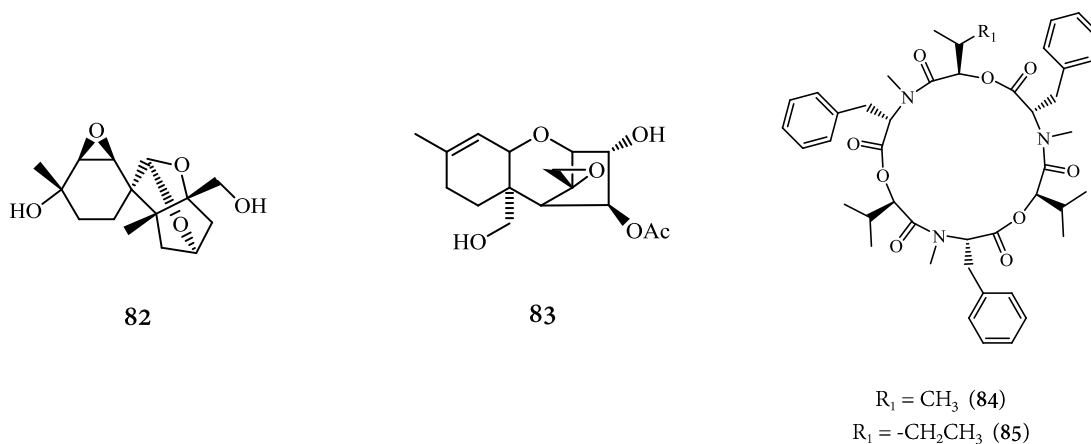


Figura 13b. Metabolitos aislados de la especie *P. tenuipes*.

2.6.2 Antecedentes de la especie objeto de estudio *Purpureocillium lilacinum* (sinonimia *Paecilomyces lilacinus*)

Paecilomyces lilacinus es un hongo filamentoso aislado comúnmente de suelos, vegetación en descomposición, insectos, nematodos y como contaminante en ambientes de laboratorio; además, es causa de infección en humanos (en pacientes inmunocomprometidos) y otros vertebrados. Un estudio comparativo reciente de algunos aislamientos clínicos de este hongo con cepas aisladas de suelos, insectos y nematodos usando como métodos de identificación las secuencias del gen de rARN 18S, del espaciador transcrito interno (ITS), y del factor de elongación de traducción parcial (TEF), reveló que *P. lilacinus* no estaba relacionada con el género *Paecilomyces*. Por lo tanto, un nuevo género llamado *Purpureocillium* fue propuesto, y la nueva combinación *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson fue hecha para esta especie (Luangsa-Ard *et al.*, 2011).

Purpureocillium lilacinum ha recibido gran interés en el campo del biocontrol de plagas de cultivos de importancia económica, debido a su excelente actividad nematocida. En un estudio para determinar la actividad sobre ácaros de la manzana (*Aculus schlechtendali*), se demostró su potencial acaricida al causar el 98.22% de mortalidad en la población de estos organismos (Demirci y Denizhan 2010; Oclarit y Cumagun 2009). El control biológico del nematodo agallador

(*Meloidogyne incognita*) también ha sido evaluado con *P. lilacinum*. En un estudio reciente, se observó una reducción de la actividad del nematodo en un 66%, mientras que el crecimiento de las larvas se redujo en un 74%, y la población final de nematodos hasta en un 71%, en comparación con el agente de referencia (Kiewnick y Sikora 2006).

2.6.2.1 Metabolitos aislados de *P. lilacinum*

El estudio químico de *P. lilacinum* ha tenido gran interés desde su descubrimiento como agente patógeno de diferentes organismos. En un análisis de varias cepas de *P. lilacinum* aisladas de insectos, nematodos y humanos, se obtuvieron las paecilotoxinas A – D (86 – 89, Figura 14). Estos péptidos lineales, también llamados leucinostatinas, mostraron actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram-positivas (Mikami *et al.*, 1989). Se ha demostrado que estas micotoxinas están presentes en la infección de insectos y nematodos, no obstante su ausencia no altera la capacidad nematicida del hongo (Khan *et al.*, 2003).

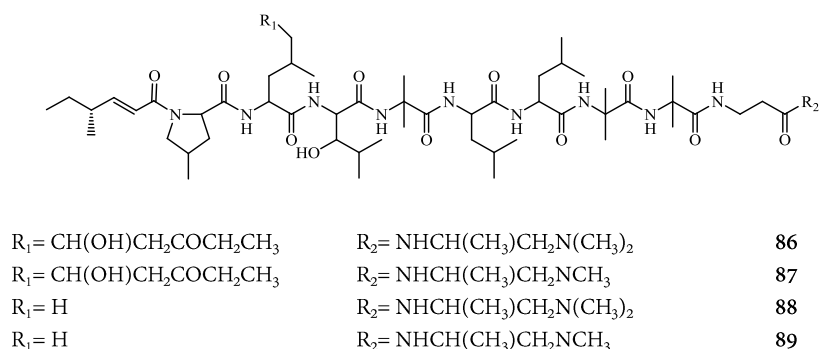


Figura 14. Paecilotoxinas aisladas de *Purpureocillium lilacinum*.

El estudio químico de una cepa derivada de una esponja marina (*Petrosia* sp.) condujo al aislamiento de varias α -pironas (90 – 94) y ciclohexenonas (95 – 103), las cuales sólo se habían reportado para especies del género *Alternaria* y *Phoma*. Ninguno de los productos fúngicos presentó actividad significativa en contra de líneas celulares de diversos tumores (Elbandy *et al.*, 2009). A partir de una muestra marina obtenida en el Océano Índico (a 200 m profundidad), se aislaron algunos ácidos de cadena larga, entre los que destacan la 1,2-dilinolilglicero-*O*-4'-*(N,N,N*-

trimetil) homoserina (**104**) y el metil miristato (**105**), así como los compuestos aromáticos indol-3-carboxaldehído (**106**), ácido indoil-3-carboxílico (**107**) y el ácido 4-hidroxibenzóico (**108**). La actividad citotóxica de estos metabolitos fue moderada (Cui *et al.*, 2013). Un análisis reciente de una cepa aislada de suelos en la localidad de Minas Gerais en Brasil, condujo al aislamiento de la militarinona A (**72**), descrita anteriormente para la especie *P. militaris*. Tanto el extracto orgánico como la paecilomida aislada mostraron tener buena actividad en un ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa (91 % y 57.5 % de inhibición, respectivamente), actividad relacionada con la enfermedad del Alzheimer (Teles y Takahashi 2013; **Figura 15**).

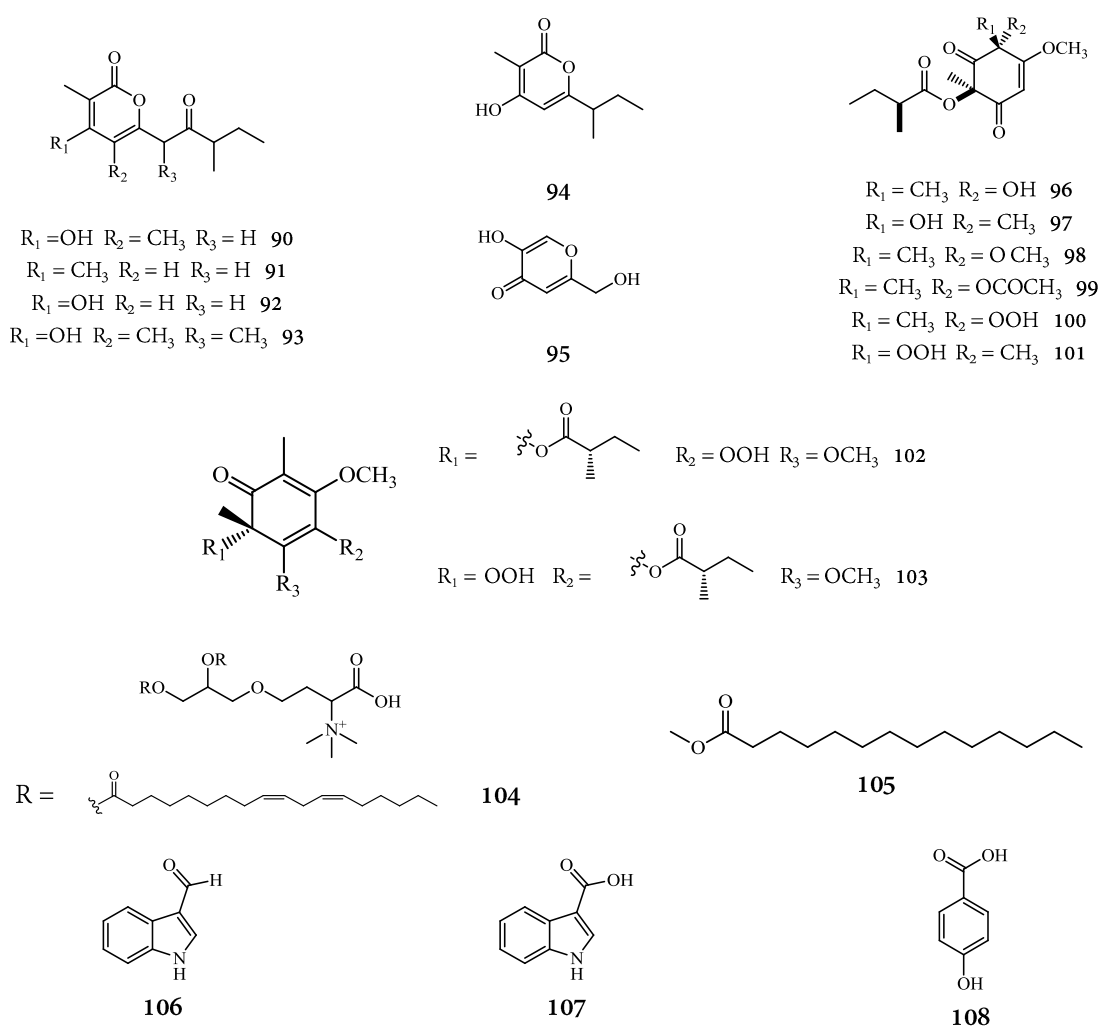


Figura 15. Metabolitos aislados de *Purpureocillium lilacinum*.

2.6.3 Antecedentes de la especie objeto de estudio *Isaria fumosorosea* (sinonimia *Paecilomyces fumosoroseus*)

Por más de 30 años, la especie *Isaria fumosorosea* se clasificó como *Paecilomyces fumosoroseus*, pero después de un exhaustivo trabajo por parte de diversos grupos de taxónomos, se movió al género *Isaria* (Zimmermann 2008). En diferentes investigaciones filogenéticas se demostró que el género *Paecilomyces* es polifilético (su origen evolutivo es de más de un ancestro común y está constituido por la unión artificial de ramas dispersas del árbol evolutivo). Luangsa-Ard *et al.*, (2005) estudió las relaciones filogenéticas de las especies pertenecientes a *Paecilomyces* sección *Isarioidea* usando el espaciador de traducción interna (ITS) de rADN. Ellos encontraron que la sección es polifilética entre los Hypocreales (Ascomycota), y un grupo fue reconocido y designado como *Isaria*, el cual incluye a la especie *Isaria fumosorosea* (Zimmermann 2008).

Esta especie es patógena para más de 40 insectos y es uno de los patógenos fúngicos más comunes que causan infección rápida y muerte de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Actualmente, el hongo *I. fumosorosea* está registrado como micopesticida y está bajo desarrollo comercial para control microbiológico de las mosquitas blancas (Wraight *et al.*, 2001). En países como México, Venezuela y los Estados Unidos de América se emplea como una alternativa más viable debido a su poca toxicidad ambiental (Mier *et al.*, 2005).

2.6.3.1 Metabolitos aislados de *Isaria fumosorosea*

La beauvericina (109) fue aislada en 1975 de una cepa obtenida en Baarn, Holanda (Bernardi *et al.*, 1975). Este ciclohexadepsipéptido ha sido considerado recientemente como una micotoxina de la familia de las enniantinas producida por diferentes especies de *Fusarium* (*Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium subglutinans*) que infectan maíz, arroz y trigo (Luangsa-ard *et al.*, 2009). No obstante, fue reportada por primera vez

a partir de *Beauveria bassiana*, aislada con base en un ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* (Hamill *et al.*, 1969). La beauvericina (**109**) ha sido sujeto de numerosos estudios biológicos que han permitido comprobar sus efectos insecticida, antitumoral, antibacteriana, antifúngica y antiviral (Wang y Xu 2012).

El ácido dipicolínico (**110**) y el ácido oxálico (**111**) aislados de *I. fumosorosea*, han demostrado un gran potencial como agentes insecticidas (Asaff *et al.*, 2006). El ácido dipicolínico es un metabolito conocido de varias especies patógenas de insectos incluyendo *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*, pero también es producido por un número de especies de *Penicillium* que no son entomopatógenas (Claydon y Grove 1982). La actividad insecticida del ácido dipicolínico es similar a la reportada para el ácido oxálico (Cordon y Schwartz 1962). Las estructuras se muestran en la **Figura 16**.

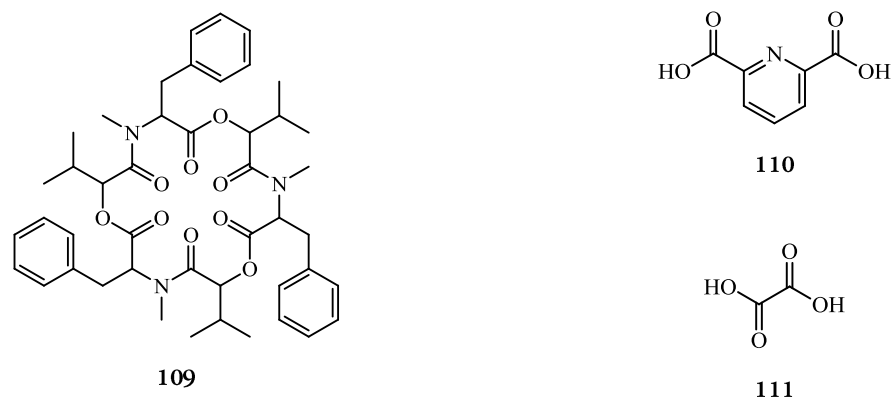


Figura 16. Metabolitos aislados de *I. fumosorosea*.

Las beauverólidas L (**112**) y L_a fueron aisladas de *I. fumosorosea* por primera vez en 1994 (Jegorov *et al.*, 1994). Estos metabolitos pertenecen a la familia de los depsipéptidos cíclicos aislados de varias especies entomopatógenas del género *Beauveria* (*B. bassiana*, *B. brogniartii* y *B. vermiformis*) y de *Isaria fumosorosea*. Las beauverólidas son ciclotetradepsipéptidos lipofílicos y neutros, que contienen residuos lineales y ramificados de C₉- o C₁₁-β-hidroxi ácidos. En diversos análisis para determinar el perfil metabólico de las especies que producen estos ciclodepsipéptidos,

se ha detectado la presencia de las beauverólidas C (113), F (114), I (115), J (116), M (117), N (118) y P (119) en aislamientos de *I. fumosorosea* (Jegorov *et al.*, 2004; Kuzma *et al.*, 2001). La estructura de las beauverólidas se muestra en la **Figura 17**.

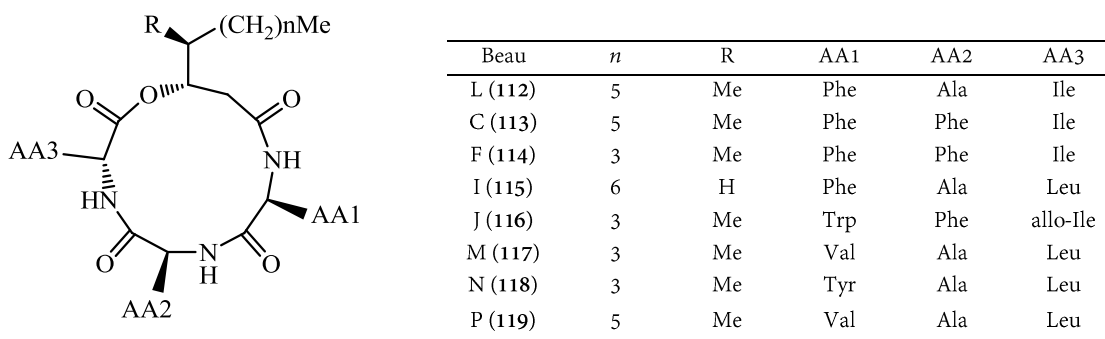


Figura 17. Beauverólidas presentes en la especie *I. fumosorosea*.

La función biológica esencial de las beauverólidas no está claramente definida. Varias pruebas biológicas han indicado que las beauverólidas no exhiben efectos bactericidas, fungicidas o actividad insecticida directa. Sin embargo, se ha postulado que pueden estar involucradas en procesos de inmunomodulación en insectos. El aislamiento de nuevas beauverólidas de especies de *Beauveria* durante un estudio enfocado a la búsqueda de inhibidores de la formación de células espumosas generadas por macrófagos (Namatame *et al.*, 1999) ha impulsado el interés en la investigación de las propiedades biológicas de estos metabolitos, sintetizando bibliotecas de beauverólidas por química combinatorial (Nagai *et al.*, 2008, Tomoda y Doi 2008). Se espera que estos compuestos puedan ser útiles en la inhibición de la progresión de la aterosclerosis, enfermedad relacionada con la formación de células espumosas. Además, desde el punto de vista quimiotaxonómico, las beauverólidas pueden servir como marcadores de tipos inusuales de infecciones fúngicas causadas por especies de *Beauveria* o *Isaria* (Jegorov *et al.*, 2004).

3. Justificación

La importancia del descubrimiento de nuevos inhibidores de la CaM radica en la posibilidad de descubrir nuevos fármacos potenciales (por ejemplo antitumorales, espasmolíticos o tranquilizantes) y/o valiosas herramientas de investigación para el mejor entendimiento de los procesos fisiológicos en los que está involucrada esta importante proteína.

Dentro de las fuentes naturales de inhibidores de la CaM que actualmente tienen un gran impacto, se encuentran los microorganismos, incluyendo los hongos ascomicetos. A la fecha, aproximadamente 100,000 especies fúngicas han sido descritas, aunque se estima que existen más de un 1,000,000. La variedad de especies y la diversidad de sus hábitats, algunos poco explorados, permiten concluir que los hongos continúan siendo una fuente rica de nuevos metabolitos. De acuerdo a investigaciones en la última década, hongos terrestres, coprófilos, fitopatógenos, marinos y entomopatógenos representan una importante fuente de inhibidores de la CaM útiles para el desarrollo de fármacos, pesticidas o herramientas de investigación. Estas consideraciones sirvieron de base para formular la presente investigación.

4. Objetivo Principal

Descubrir nuevos inhibidores de la proteína calmodulina de utilidad potencial para el desarrollo de fármacos y/o herramientas de investigación a partir de hongos ascomicetos selectos de la biodiversidad fúngica de México.

4.1 Objetivos Particulares

- i. Aislar los hongos a partir de diferentes sustratos mediante las técnicas microbiológicas adecuadas.
- ii. Encontrar las condiciones adecuadas para la fermentación de los microorganismos fúngicos aislados.

- iii. Cultivar en pequeña escala los microorganismos fúngicos con la finalidad de seleccionar las especies más adecuadas para la obtención de inhibidores de la CaM con base en la mejor actividad observada en un ensayo de fluorescencia.
- iv. Cultivar en mediana escala las dos especies fúngicas seleccionadas con la finalidad de obtener los productos naturales bioactivos, mediante la aplicación de procedimientos convencionales. Con el aislamiento y la purificación de los principios biodinámicos se logrará la obtención de compuestos en forma pura y en cantidades apropiadas para la determinación de sus estructuras químicas y la valoración de su actividad anti-CaM.
- v. Determinar la estructura molecular de los compuestos activos. La aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas permitirá la elucidación de la estructura molecular de los principios activos. Es altamente probable que el cumplimiento de este objetivo conduzca a la caracterización de sustancias con esqueletos inéditos, mismas que pueden constituir nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de agentes anti-CaM.
- vi. Evaluar la interacción de los principios activos puros con la proteína calmodulina utilizando ensayos enzimáticos y de fluorescencia.
- vii. Determinar el posible modo de unión de los metabolitos aislados con el complejo Ca^{2+} -CaM mediante estudios teóricos de acoplamiento molecular (docking).
- viii. Determinar la posible actividad vasorrelajante de las malbranqueamidas en un ensayo utilizando aorta de rata pre-contraída con noradrenalina. Además, determinar el mecanismo de acción por el cual ejercen dicha actividad.

5. Parte Experimental.

5.1 Material fúngico

La especie *Purpureocillium lilacinum* (sinonimia *Paecilomyces lilacinus*) se aisló en forma pura a partir de una muestra de suelo, tomada en una cueva en la localidad de Juxtlahuaca (17°25'36'' N, 99°7'34'' O) en el Estado de Guerrero, México. Una muestra de referencia fue depositada en el Herbario Nacional de México (MEXU) bajo el número MEXU26014. La identificación y clasificación de la especie fúngica fue establecida por la Dra. María del Carmen González Villaseñor (Instituto de Biología, UNAM) y el Dr. Anthony E. Glenn (Toxicology & Mycotoxin Research Unit, USDA-ARS, Georgia, EUA). El número asignado en el GenBank para esta especie (cepa RRC 1815; gen del factor de elongación de traducción 1 alfa [TEF]) es KC708022.

La especie *Isaria fumosorosea* (sinonimia *Paecilomyces fumosoroseus*) fue proporcionada por la Dra. Concepción Toriello de la Facultad de Medicina, UNAM. Esta especie se obtuvo del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, México, y originalmente fue aislada a partir de *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*). Una muestra de referencia (EH-503/3) fue depositada en la colección fúngica del Laboratorio de Micología Básica, del Departamento de Parasitología y Microbiología, en la Facultad de Medicina de la UNAM.

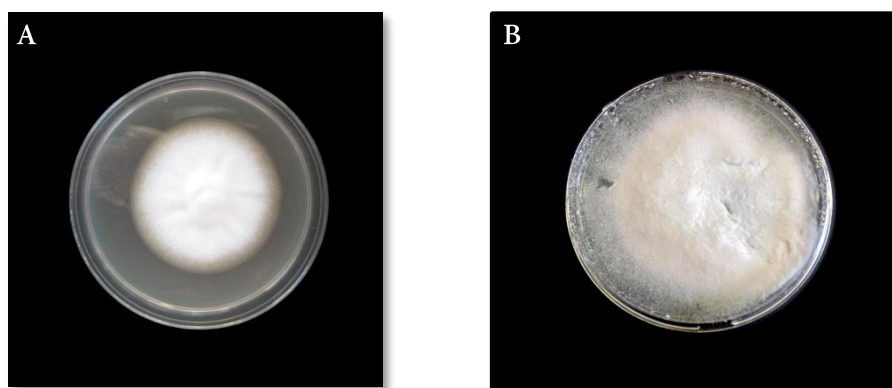


Figura 18. Cultivo de los hongos (A) *Purpureocillium lilacinum* y (B) *Isaria fumosorosea*, crecidos en medio agar papa-dextrosa por 21 días.

5.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla de 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones, empleando diversos sistemas de elución. Como agentes cromógenos se emplearon soluciones de sulfato cérico amoniacal y Dragendorff. Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron utilizando como fase estacionaria gel de sílice (gel de sílice 60, Merck) y empleando diferentes sistemas de elución como eluyentes (hexano, cloruro de metileno y metanol).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore, Corp., Waters Chromatography Division Miliford, MA, USA) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA, 996). Los análisis cromatográficos se realizaron empleando columnas empacadas con gel de sílice: SymmetryPrep® 7 µM (Waters®) [7.8 x 300 mm, 2.5 mL/min], Symmetry® 5µM (Waters®) [4.6 x 250 mm, 0.5 mL/min] o PurospherSTAR® 5 µM (MERCK®) [4.6 x 250 mm, 0.7 mL/min]. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 210, 275 y 325 nm. Los análisis en cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) se llevaron a cabo en un equipo Acquity, Waters® empleando una columna Acquity UPLC BEH-C18 [1.7 µM, 2.1 x 100 mm] y acetonitrilo y agua desionizada acidificados (ácido fórmico 0.1%) como fase móvil. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower Waters® versión 2.0 y 3.0 para la modalidad CLAE y CLUE, respectivamente.

5.3 Fermentación de las especies fúngicas objeto de estudio

En todos los casos, las muestras fúngicas se sembraron en medio agar papa-dextrosa (APD) por triplicado y se observó la viabilidad y pureza de dichos cultivos por un periodo de 21

días. Para el estudio químico de los hongos, el crecimiento se llevó a cabo en dos fases: una fase preliminar en pequeña escala, y la segunda fase en mediana escala.

Para la fermentación en pequeña escala, se preparó un cultivo semilla empleando tubos cónicos de 20 mL de capacidad conteniendo 10 mL de caldo papa-dextrosa (CPD), fueron inoculados con una muestra del hongo objeto de estudio. Tras un periodo de 10 días, el contenido de estos tubos sirvió como inóculo para sembrar matraces de 250 mL de capacidad conteniendo ya sea medio CPD (100 mL), medio V8 (100 mL) o medio arroz (30 g de arroz en 50 mL de agua), previamente esterilizados.

El crecimiento en mediana escala se desarrolló con base en los resultados obtenidos en la fase preliminar. Una vez determinadas las mejores condiciones para el crecimiento de las especies fúngicas (fase en pequeña escala), se preparó el cultivo semilla de la misma manera que en el punto anterior y se inocularon matraces Fernbach de 2.8 L de capacidad, conteniendo CPD (1.4 L) o medio arroz (300 g en 500 mL de agua).

5.4 Preparación de los extractos orgánicos

En el caso de los cultivos líquidos (CPD), al término del periodo de fermentación el micelio generado se separó del medio de cultivo mediante filtración rápida sobre gasa estéril. El extracto orgánico del medio de cultivo se obtuvo mediante procesos de reparto sucesivos empleando cloruro de metileno (CH_2Cl_2) como disolvente. Las fases orgánicas resultantes se reunieron y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). El extracto orgánico del micelio se preparó por maceración (7 días), empleando una mezcla de diclorometano-metanol (9:1). Al término de la extracción, se juntaron las fases y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y concentraron al vacío. Ambos extractos se reunieron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica.

En el caso de los medios preparados con arroz, el extracto orgánico se elaboró mediante maceración empleando una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) por 7 días, al menos dos veces. Las fases orgánicas se juntaron, se eliminó la humedad (con Na_2SO_4 anhidro) y se concentró al vacío.

5.5 Estudio químico de la especie fúngica *Purpureocillium lilacinum*

5.5.1 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto orgánico total combinado (medio de cultivo y micelio, 980 mg), se redisolvió en una mezcla de acetonitrilo (MeCN) y metanol (MeOH) en una proporción 1:1. Esta solución se sometió a un proceso de reparto exhaustivo con hexano (1:1) al menos tres veces. Las fracciones de MeCN-MeOH se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron *in vacuo*. El extracto resultante (FII, 350 mg) se sometió a un análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), en fase reversa.

5.5.2 Aislamiento, purificación e identificación de la acremonidina A (119) y de la acremoxantona C (122)

Se llevó a cabo un análisis cromatográfico por CLAE de la fracción Fx II en una columna PurosphereSTAR RP-C18 (4.6 mm x 250 mm) con gradiente empezando con 50% MeCN en agua, a 80% MeCN, en 15 minutos, y 100% MeCN por 30 minutos, a un flujo de 3.0 mL/min. Este análisis permitió el aislamiento y la purificación de dos productos caracterizados como acremonidina A (**121**, 21.0 mg, t_R 21.9 min) y la acremoxantona C (**122**, 115 mg, t_R 26.2 min).

5.6 Estudio químico de la especie *Isaria fumosorosea*

Al término del periodo de fermentación se preparó el extracto orgánico mediante procesos de maceración empleando una mezcla de diclorometano-metanol (9:1). Los extractos orgánicos se juntaron para su posterior fraccionamiento.

5.6.1 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto orgánico combinado (820 mg) se sometió a un proceso de reparto entre una mezcla de MeCN:MeOH y hexano (25:25-50) con el objetivo de desgrasar el extracto. La fracción polar (FPf-II, 251 mg) se lavó sucesivamente con porciones frescas de MeOH, y se separó el precipitado generado en el lavado (FPfII-p, 56 mg). La fracción soluble en MeOH (FPfII-s, 195 mg) se analizó posteriormente por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

5.6.2 Análisis por CLUE-EM de la fracción FPfII-s

La fracción FPfII-s se analizó por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) acoplada a espectrometría de masas (EM), en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, de la UNAM. La muestra (2.0 mg) se disolvió en una mezcla de MeCN-MeOH (9:1) y se inyectó al cromatógrafo, empleando una columna fase reversa C18 (1.7 μm , 2.1 x 100 mm).

5.6.3 Establecimiento del perfil cromatográfico de la fracción FPfII-s

La fracción FPfII-s se sometió a un análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) con detección de arreglo de fotodiodos (PDA). Tras una serie de ensayos, se logró obtener el perfil cromatográfico resuelto de la fracción FPfII-s empleando una columna Symmetry (5 μM , 4.6 x 250 mm, 0.5 mL/min) con fase móvil isocrática (MeCN:H₂O; 9:1).

5.6.4 Obtención de los metabolitos secundarios de la especie *Paecilomyces fumosoroseus* a partir de la fracción FPfII-s

Las condiciones de análisis que permitieron la resolución del perfil cromatográfico de la fracción FPfII-s fueron escaladas a modo semi-preparativo, empleando una columna SymmetryPrep (7 μM , 7.8 x 300 mm, 2.5 mL/min) con la finalidad de aislar los metabolitos mayoritarios. Con estas condiciones se logró purificar siete ciclotetradepsipéptidos, identificados

como las beuverólidas L (112, 4.7 mg), C (113, 3.3 mg), F (114, 2.8 mg), I (115, 13.4 mg), J_a (116, 3.0 mg), M (117, 6.1 mg) y N (118, 3.4 mg).

5.7 Obtención de las malbranqueamidas (51-53) a partir de la especie fúngica

Malbranchea aurantiaca

La obtención de los alcaloides malbranqueamidas, se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Madariaga y Figueroa (Madariaga-Mazón, A., 2010; Figueroa, M. *et al*, 2011). Brevemente, se inocularon 25 L de CPD con una muestra stock del hongo *Malbranchea aurantiaca* (hongo obtenido de suelos volcánicos, voucher depositado en la colección de Micopatología, del Instituto de Biología de la UNAM No. 24428). Después de la incubación (30 días), se obtuvieron los extractos del medio de cultivo y micelio y se combinaron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica (12.0 g). Seis gramos del extracto fueron disueltos en CH₂Cl₂ y se llevó a cabo un proceso de reparto con HCl 1N. Posteriormente, los extractos ácidos fueron basificados con NH₄OH 1 N (pH 9) y extraídos nuevamente con CH₂Cl₂. La fracción orgánica resultante (591 mg) fue resuelta por CLAE en una columna fase reversa Purosphere STAR (5 μ, 4.6 x 250 mm, 2.0 mL/min] eluida con MeCN, para obtener a la malbranqueamida pura (51, 199.2 mg; t_R 7.4 min), y una mezcla de la malbranqueamida B (52) y la isomalbranqueamida B (53). Éstas últimas fueron resultas usando una columna Nucleosil C18 (4 μm, 10 x 250 mm) eluida con MeOH (2.0 mL/min) para obtener 52 (19.2 mg; t_R 7.05 min) y 53 (19.2 mg; t_R 7.05 min) en forma pura.

5.8 Ensayos biológicos

5.8.1 Apagamiento de la fluorescencia de los biosensores de calmodulina

El efecto de los extractos y/o productos puros sobre la proteína calmodulina se determinó mediante un método espectrofluorimétrico, utilizando los biosensores fluorescentes de CaM *hCaMM124C-mBBR*, *hCaMT110C-mBBR* y *hCaMM124C-AF₃₅₀*, de acuerdo al procedimiento

descrito por González-Andrade y colaboradores (González-Andrade, M., *et al* 2009). En cada caso, la solución proteica se suspendió en amortiguador de acetato de potasio 5 mM y 10 mM de CaCl₂ y pH final de 5.1, y se tituló con una solución de 2 mM para el caso de los productos puros, o bien de 2000 ppm para los extractos o fracciones. El cambio en la fluorescencia de la proteína en presencia de los extractos/fracciones/compuestos de prueba se registró en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 37 °C. Los datos se adquirieron mediante el software VINCI 1.6.SP4 (Experiment & Instrument Control). La longitud de onda de excitación (λ_{ex}) para el biosensor fue de 381 nm y la longitud de emisión (λ_{em}) fue adquirida en el rango de 400-550 nm, con diez integraciones y cada dos nanómetros. Los cambios en los espectros de fluorescencia fueron analizados para obtener la K_d del complejo proteína-ligante, utilizando la siguiente ecuación:

$$y = \frac{(1 + K_d/S + L/S) - \sqrt{(1 + K_d/S + L/S)^2 - 4 L/S}}{2}$$

en donde P y L son la concentración de proteína y ligante respectivamente presentes, y K_d es la constante de disociación. Todos los datos fueron analizados utilizando el programa Origin 8.0.

5.8.1.1 Diseño del biosensor de calmodulina *hCaMT110C-mBBr*

El diseño, construcción, purificación y modificación química del nuevo biosensor de calmodulina *hCaMT110C-mBBr* se llevó a cabo por el Dr. Martín González Andrade, de la Facultad de Medicina, UNAM y la metodología se describe a detalle por Madariaga-Mazón y colaboradores (Madariaga-Mazón, A., 2013). De manera breve, para realizar la clonación y subclonación de la proteína se empleó el sistema pGEM-T Easy Vector System I y el vector pET12b con restricción de enzimas *NdeI* y *BamHI*, la sustitución de aminoácidos se llevó a cabo con el kit Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA). La amplificación por PCR incluyó 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, y se templó usando una rampa de temperatura de 45 a 60 °C, a una velocidad de calentamiento de 0.2 °C / seg, polimerización a 68 °C por 10 minutos, seguido de un paso final de extensión a 68 °C por 10 min. Después de los experimentos de

mutagénesis, los productos de amplificación de PCR fueron digeridos y transformados. La secuencia de construcción y mutación fue confirmada por secuenciación de nucleótidos con un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los plásmidos (pET12b-*hCaM* T110C) fueron transformados con *E. coli* BL21-AI One Shot[®].

Después del crecimiento bacteriano por una noche, y hasta haber alcanzado una densidad óptica adecuada del medio (0.8 – 1.0, a 550 nm), se indujo la expresión por la adición de L-(+)-arabinosa (0.2% p/p). Las células se centrifugaron y resuspendieron en una solución amortiguadora de Tris-HCl (50 mM), adicionada con EDTA (2 mM), DTT (1 mM) y lisozima (200 mg/mL) a pH 7.5, incubado todo en hielo por 30 min. Las células fueron lisadas por sonicación y separadas por centrifugación a 15,000 g. El sobrenadante se separó y la proteína se purificó usando una columna cromatográfica Phenyl-Sepharosa CL-4B, determinando su pureza mediante electroforesis en gel.

Por último, se llevó a cabo la modificación química de la cisteína con el fluoróforo *mBBr* de la siguiente manera: una solución de DTT (5 mM) fue añadida a la proteína purificada (5-10 mg/mL) por 12 h, y lavada en una columna de filtración de gel (HR-100). La conjugación del fluoróforo se llevó a cabo por una noche, añadiendo el reactivo (en 20 % en DMSO) en pequeñas cantidades hasta alcanzar una concentración final en exceso de diez molar, y 5% de DMSO. La separación de la proteína del fluoróforo que no reaccionó se realizó mediante cromatografía de exclusión (columna Sphdex 75).

El efecto de los metabolitos **121** y **122** puros sobre el biosensor fluorescente *hCaMT110C-mBBr* de la CaM se llevó a cabo de igual manera que para el biosensor *hCaMM124C-mBBr*, descrito en el punto anterior.

5.8.2 Actividad vasorrelajante de las malbranqueamidas sobre anillos de aorta de rata

El experimento para determinar la actividad vasorrelajante de 51-53 se realizó en colaboración con el Dr. Samuel Estrada Soto, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, siguiendo un protocolo modificado de Saponara (Saponara *et al.*, 2006). El ensayo se realizó en anillos de aorta de ratas Wistar (200-300 g) adaptadas a las condiciones estándares del bioterio: temperatura de 25 °C, humedad relativa de 45-65 %, ciclos de luz 12 h luz/oscuridad y alimento/agua *ad libitum*.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y a las recomendaciones realizadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para pruebas Farmacológicas y Toxicológicas.

Para la obtención del tejido, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (1 mL/2.5 kg de peso) y sacrificados por dislocación cervical. A continuación, se realizó una disección por el abdomen y la porción de la aorta correspondiente a la caja torácica fue removida, limpiada y cortada en anillos de entre 3 y 5 mm de longitud. De manera adicional, en algunos de los anillos aórticos se retiró el endotelio mediante procedimientos manuales.

Después, para determinar el efecto contráctil o relajante sobre los anillos de aorta, cada fragmento de tejido se suspendió en una cámara de órgano aislado conteniendo una solución de Ringer Krebs (composición en mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; EDTA, 0.026 y glucosa, 11.1; a pH 7.4), incubado a 37 °C, continuamente gasificado con O₂/CO₂ (9:1). Los tejidos se colocaron bajo una tensión de reposo de 3.0 g, y se dejaron estabilizar durante un periodo de 60 min, llevando a cabo lavados cada 15 min con solución de Krebs atemperada. Las señales de contracción se registraron con un transductor de fuerza isométrica Grass Modelo FT 03, conectado a un polígrafo BIOPAC system UIM 100C. Posterior al periodo de estabilización, los tejidos fueron estimulados con una solución de noradrenalina (NA) 0.1 μM durante 10 min y después lavados con porciones frescas de solución de

Krebs. Este procedimiento se repitió tres veces en intervalos de 30 min antes de iniciar la evaluación de los compuestos de prueba. La ausencia o presencia de la capa endotelial se confirmó por la falta de una respuesta relajante inducida por una solución de carbacol (1 μM).

Finalmente, todos los tejidos fueron contraídos con noradrenalina (NA), y las muestras de prueba (compuestos puros o control positivo) se añadieron a la cámara de incubación en concentraciones acumulativas de cuarto de logaritmo (periodo de evaluación). El efecto relajante de las muestras de prueba se determinó por su habilidad para inducir una contracción vascular máxima antes y después de su adición a la cámara de incubación. Referirse al esquema representado en la **Figura 19**.

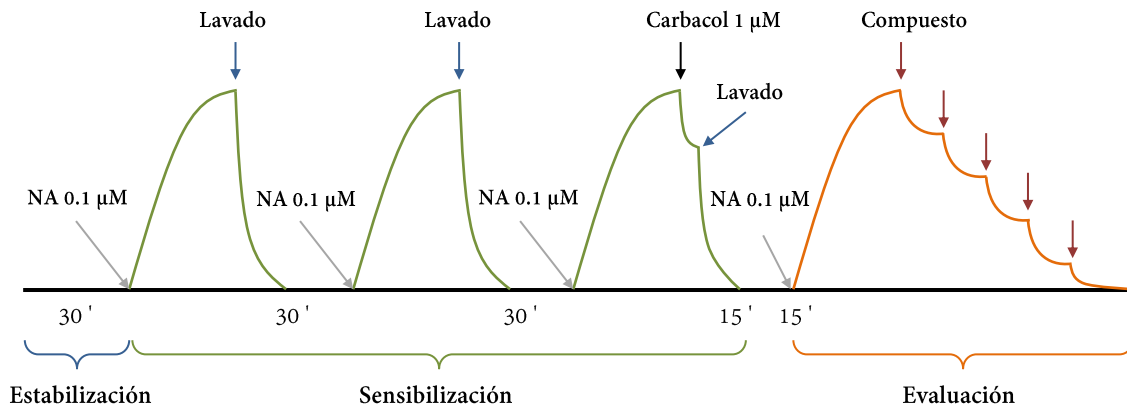


Figura 19. Representación esquemática del experimento vasorrelajante de las malbranqueamidas.

5.8.2.1 Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante

Con el objetivo de obtener evidencia del modo de acción vasorrelajante ejercida por las malbranqueamidas, se emplearon inhibidores enzimáticos clave en las rutas de señalización a través del ensayo de anillos aórticos de rata. Para ello, quince minutos antes de la última estimulación con NA, los anillos de aorta se incubaron ya sea con L-NAME (éster metílico de L-nitroarginina; 10 μM), atropina (1 mM), tetraetilamonio (TEA, 5 mM) o indometacina (10 μM)

respectivamente. Después, se añadió el compuesto puro a diferentes concentraciones y se obtuvieron las correspondientes curvas de concentración-respuesta.

5.9 Cálculos de modelado molecular

5.9.1 Preparación de las estructuras

Todas las estructuras se construyeron mediante el programa Spartan'02 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). La búsqueda conformacional para los diferentes isómeros estructurales se realizó usando un protocolo Monte Carlo implementado en el mismo programa de modelado molecular, bajo un campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (Molecular Mechanics Force Field 94). El proceso de búsqueda se repitió al menos dos veces, tomando como punto de partida diferentes geometrías con el fin de obtener el mayor número de estados conformacionales.

5.9.2 Análisis conformacional, optimización geométrica y cálculos de propiedades físicas

Los conformeros resultantes se analizaron y filtraron de acuerdo a su energía, cuidando de dejar los duplicados fuera del estudio. La diferencia de energía fue de 10 kcal/mol, seleccionada con el fin de tener una amplia ventana de conformeros en la distribución de Boltzmann. Posteriormente, todos los conformeros fueron geoméricamente optimizados usando teoría de funcionales de la densidad (DFT) con el método híbrido B3LYP y el conjunto de funciones base DGDZVP, mediante el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA). Las estructuras una vez optimizadas, se emplearon para calcular los parámetros termoquímicos y frecuencias a 1 atm y a 298 K. Las constantes de acoplamiento (^1H - ^1H , y ^{13}C - ^1H) para las estructuras se calcularon empleando la opción *spinspin* implementada en el paquete Gaussian 09 durante los cálculos de RMN por el método GIAO (Gauge Invariant Atomic Orbital). Los cálculos para determinar los valores de rotación óptica fueron realizados con el mismo nivel de teoría

(B3LYP/DGDZVP). Ambas propiedades fueron ponderadas mediante la distribución Boltzmann, tomando en cuenta la población conformacional arrojada por el cálculo con DFT.

Todos los cálculos se llevaron a cabo en un sistema operativo Linux implementado en la supercomputadora KanBalam de la UNAM, un clúster de computadoras Hewlett-Packard con 1369 procesadores AMD Opteron de 2.6 GHz y 3 terabytes de memoria RAM.

5.9.3 Acoplamiento y reconocimiento molecular

Los estudios de acoplamiento molecular (docking) se realizaron con el programa AutoDock 4.2 (<http://www.autodock.scripps.edu/>). Las estructuras cristalográficas de la CaM y de la NOS fueron obtenidas del Protein Data Bank (PDB, RCSB) bajo los códigos 1A29 y 1XA5 para el caso de la CaM, y 3NOS y 3HR4 para el caso de la NOS. La adición de átomos de hidrógenos polares, cargas Kollman y parámetros de solvatación para la proteína, se llevó a cabo mediante la paquetería AutoDock Tools 1.5.4 (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). Se partió de las estructuras de mínima energía de los diferentes ligantes para llevar a cabo el estudio de docking y fueron preparadas con la misma paquetería (ADT) mediante la adición de cargas atómicas Gasteiger-Marsilli y átomos de hidrógeno no polares. El estudio de docking se llevó a cabo usando los parámetros establecidos en el programa, cambiando el número de corridas (1000) y la búsqueda local por medio de un Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), así como el número de evaluaciones energéticas por corrida (25 000 000). Inicialmente, se llevó a cabo un docking ciego, colocando al ligante en una posición al azar, y construyendo una caja de reconocimiento molecular para la proteína de 120 Å x 110 Å x 110 Å en las dimensiones x , y y z , con la proteína al centro de la caja. Posteriormente, se realizó un refinamiento con un tamaño de caja menor (60 Å x 60 Å x 60 Å), con el centro de la rejilla correspondiente al ligando en la posición con la menor energía obtenida en el docking ciego.

Las posiciones de acoplamiento obtenidas se analizaron con el programa ADT mediante el análisis por clúster, y la representación esquemática en dos y tres dimensiones de las interacciones se llevó a cabo con los programas LigPlot⁺ y Pymol, respectivamente.

5.10 Análisis estadístico

La información está expresada como la media de los experimentos \pm el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés) para el número de animales usados ($n = 6$). Las gráficas se construyeron y los datos experimentales se ajustaron mediante la herramienta de ajuste-no lineal, implementada en la paquetería estadística Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA). El análisis estadístico fue realizado por análisis de varianza de una vía seguido de las pruebas de Duncan y de Tukey. Los valores de P menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

6. Resultados y Discusión

Como parte de un programa multidisciplinario enfocado a la búsqueda de inhibidores de la CaM a partir de ascomicetos selectos, se llevó a cabo el estudio químico de *Purpureocillium lilacinum* e *Isaria fumosorosea*, obtenidas de suelo volcánico y mosquita blanca, respectivamente. De manera adicional, y con el fin de complementar un trabajo previo sobre el efecto anti-CaM de tres alcaloides indólicos del coprófilo *Malbranchea aurantiaca*, se estudió su actividad vasorrelajante potencial en anillos de aorta de rata pre-contráidos con NA.

Para el estudio de los dos primeros hongos se utilizó una estrategia experimental clásica que abarcó el aislamiento de los hongos, su fermentación en pequeña escala en diferentes condiciones de cultivo, y la preparación de sus extractos orgánicos para seleccionar los más apropiados como inhibidores de la CaM. La selección de las especies y sus condiciones de cultivo se hizo con base en los resultados obtenidos al evaluar el efecto de sus preparados orgánicos sobre el apagamiento de la fluorescencia de los biosensores de CaM (*hCaMM124C-mBBr*, *hCaMT110C-mBBr* y *hCaMM124C-AF₃₅₀*) así como los rendimientos y complejidad de los mismos. El apagamiento de la fluorescencia del biosensor indica *a priori* que los extractos contienen ligantes de CaM.

En una segunda etapa, se realizaron las fermentaciones en mediana escala con el objetivo de aislar a los metabolitos activos. Esto se logró mediante un estudio biodirigido de los organismos seleccionados, empleando técnicas cromatográficas. La caracterización de los compuestos responsables de la actividad anti-CaM, se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas convencionales y, en algunos casos, se emplearon métodos computacionales que apoyaron la elucidación completa de las estructuras. A continuación, se evaluaron los metabolitos puros como inhibidores de la proteína CaM mediante el ensayo de apagamiento de la fluorescencia. Finalmente, los compuestos que resultaron activos se sometieron a estudios de acoplamiento molecular para establecer el posible sitio de interacción con la proteína CaM.

Por último, los alcaloides obtenidos de *Malbranchea aurantiaca* fueron evaluados como agentes vasorrelajantes. Esto se llevó a cabo mediante un ensayo *ex vivo* empleado anillos de aorta de rata, con y sin endotelio, pre-contraídos con noradrenalina. Posteriormente, con la finalidad de proponer un mecanismo de acción vasorrelajante, el metabolito con mayor actividad fue evaluado en el mismo ensayo empleando experimentos farmacológicos clásicos y diferentes agonistas y antagonistas de los receptores involucrados en el proceso de vasorrelajación. Los resultados y su discusión se describen a continuación.

6.1 Obtención y caracterización de los inhibidores de CaM de *Purpureocillium lilacinum*

Para determinar las mejores condiciones de fermentación, el microorganismo se cultivó en pequeña escala utilizando diferentes condiciones de crecimiento y, posteriormente, se elaboraron los extractos, tanto del micelio como del medio de cultivo de acuerdo a la metodología que se describe en la sección experimental. Los rendimientos de los extractos obtenidos en las diferentes condiciones de crecimiento, se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Rendimientos de los extractos obtenidos en diferentes condiciones de crecimiento para *P. lilacinum*.

	Agitación			Estático		
	Exto. Caldo (mg)	Exto. Micelio (mg)	Biomasa generada (g)	Exto. Caldo (mg)	Exto. Micelio (mg)	Biomasa generada (g)
CPD ^a	61	78	4.40	189	111	9.34
V8 ^b	10.1	23.2	ND [*]	19.9	13.2	ND [*]

^aCaldo Papa-Dextrosa. ^bMedio de cultivo de ocho verduras (V8 comercial).

*ND: No fue posible determinar su peso.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 3, las condiciones de fermentación en las que se obtiene una mayor biomasa son: crecimiento estático en medio CPD, ciclo luz/oscuridad 12 h/12 h, y temperatura ambiente (25 °C).

Con la finalidad de determinar la posible presencia de metabolitos activos en el extracto orgánico total de *P. lilacinum*, se realizó un ensayo preliminar para medir el apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM empleando el biosensor *hCaMM124C-mBBr*. La evaluación inicial fue de tipo cuantitativo (del todo o nada) y las curvas de apagamiento de la fluorescencia se muestran en la **Figura 20**.

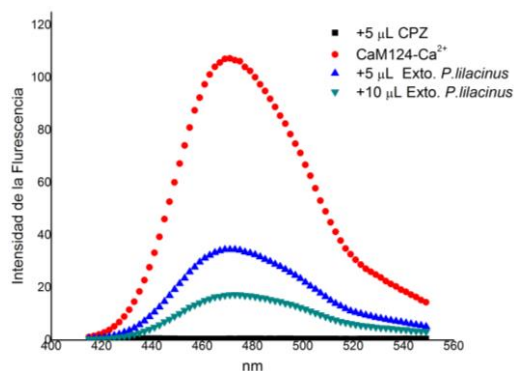


Figura 20. Apagamiento de la fluorescencia del biosensor *hCaMM124C-mBBr* por el extracto orgánico de *Purpureocillium lilacinum*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto de *P. lilacinum* presentó una actividad anti-CaM significativa, por lo que se consideró un candidato apropiado para la obtención de nuevos inhibidores de la CaM.

Posteriormente, con base en los resultados anteriores, *P. lilacinum* se cultivó en mediana escala durante un periodo de 21 días (8.4 L de medio CPD). Al cabo de este tiempo, se preparó el extracto orgánico (procesos de reparto con CH_2Cl_2), obteniendo un rendimiento final de 116 mg/L. El extracto resultante de *P. lilacinum* se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de reparto entre una mezcla a partes iguales de MeCN-MeOH y hexano (9:1) para generar dos fracciones (FI y FII). La fracción activa (FII, 350 mg) se analizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE, **Figura 21**) en fase reversa, obteniéndose la acremonidina A (**121**) y la acremoxantona C (**122**) como únicos metabolitos.

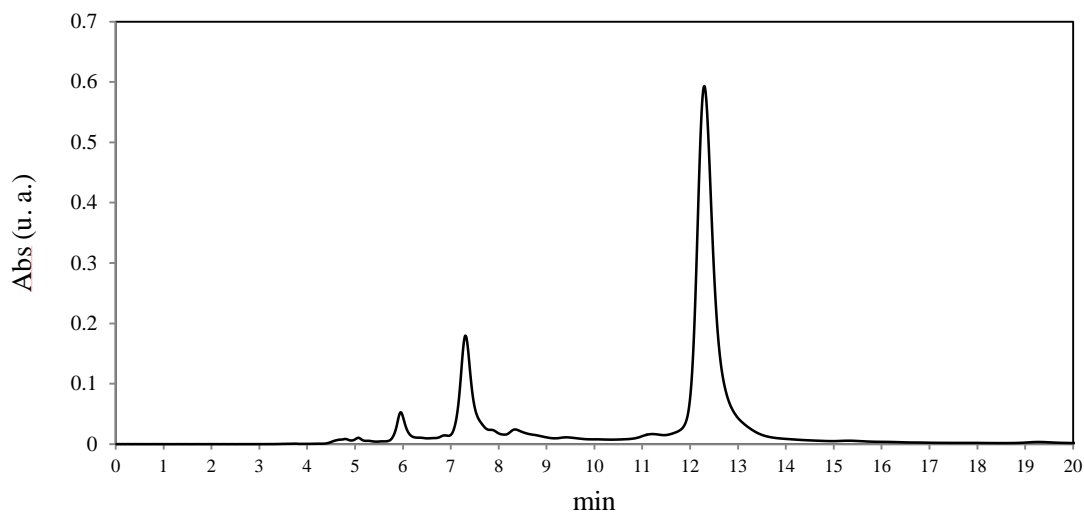


Figura 21. Cromatograma de la fracción FII de *P. lilacinum* resuelto para la acremonidina A (**121**, $t_R = 7.2$ min) y la acremoxantona C (**122**, $t_R = 12.2$ min). Columna PurosphereSTAR RP-C18 (4.6 mm x 250 mm) con gradiente: 50% MeCN en agua, a 80% MeCN en 15 minutos, y 100% MeCN por 30 minutos, a un flujo de 0.6 mL/min.

La caracterización de los metabolitos **121** y **122** se llevó a cabo por métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales (RMN de ^1H y de ^{13}C , IR y EM). Los datos espectroscópicos tanto para la acremonidina A como la acremoxantona C concuerdan con aquellos reportados en la literatura (He *et al.*, 2003; Ayers *et al.*, 2011).

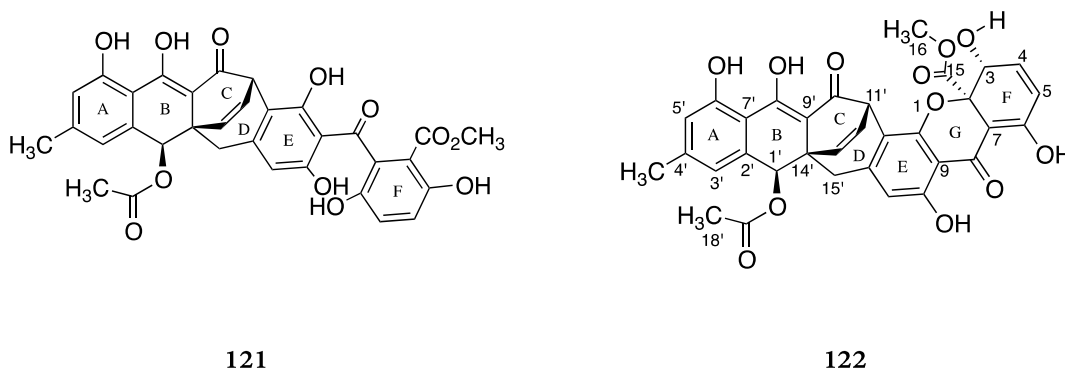


Tabla 4. Datos espectroscópicos de la cremoxantona C (122) en CDCl_3 (^1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz)

Posición	δ_{C}	δ_{H} , Mult. (<i>J</i> en Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1			
2	84.83		
3	74.76	5.29 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 2.3, 2.8	C- 2, 4, 15
4	143.90	6.50 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 2.1, 10.3	C- 2, 6
5	123.74	6.12 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 2.8, 10.3	C- 3, 7
6	171.19		
7	99.18		
8	185.23		
9	105.56		
10	159.99		
11	114.36		
12	147.73		
13	115.13	6.13 (s, 1H)	C- 9, 10, 11, 11', 13', 15'
14	154.23		
15	168.87		
16	53.27	3.69 (s, 3H)	C-15
1'	73.18	5.96 (s, 1H)	C- 2', 3', 7', 9', 14', 15', 17'
2'	136.50		
3'	123.43	6.88 (<i>d</i> , 1H) <i>J</i> = 1.3	C- 1', 7', 5', 8', 16'
4'	147.91		
5'	119.56	6.79 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 0.5, 1.5	C- 3', 6', 7', 16', 7'
6'	161.72		
7'	112.60		
8'	185.60		
9'	105.76		
10'	186.27		
11'	38.27	4.80 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 1.1, 6.6	C- 12, 13, 14, 9', 10', 13'
12'	131.91	6.42 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 6.6, 8.5	C- 10', 11', 13', 14', 15'
13'	132.66	6.08 (<i>dd</i> , 1H) <i>J</i> = 1.1, 8.5	C- 12, 13, 1', 9', 11', 14'
14'	41.63		
15'	35.30	<i>a</i> : 2.68 (<i>d</i> , 1) <i>b</i> : 2.88 (<i>d</i> , 17)	C- 12, 13, 1', 9', 13', 14'
16'	22.22	2.37 (s, 3H)	C- 3', 4', 5'
17'	170.57		
18'	21.26	1.98 (s, 3H)	C- 17'
-OH 6	14.18	14.31	C- 5, 7
-OH 10	11.10	11.21	C- 9, 10, 12
-OH 6'	11.41	11.49	C- 5', 6', 7'
-OH 8'	14.33	14.40	-

La masa molecular de **122** se determinó como $C_{33}H_{26}O_{12}$. Los espectros en el infrarrojo (IR) mostraron bandas intensas de absorción en ν_{\max} 3416, 2956, y 1738 cm^{-1} indicando la presencia de grupos hidroxilo y carbonilos de cetona conjugados. En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron 33 señales resueltas (**Figura 23b**). Por medio de experimentos de DEPT (90, 135) y experimentos bidimensionales, fue posible determinar la naturaleza de los carbonos presentes: diecinueve carbonos cuaternarios, 2 oximetinos (δ_C 73.1, 74.7), un metino sp^3 (δ_C 38.27), un metileno (δ_C 35.3), un grupo metoxilo (δ_C 53.2), dos grupos metilo (δ_C 21.2, 22.1) y siete grupos metileno sp^2 . En el espectro de RMN 1H (**Figura 23a**) se observaron 17 señales, que integran para 26 hidrógenos (ver Tabla 4). Un análisis detallado de los espectros unidimensional y bidimensional de RMN de **122** permitió establecer que éste presenta un núcleo similar al de las acremoxantonas, xantoquinodinas y beticolinas (Milat *et al.*, 1992; Tabata *et al.*, 1993; Tabata *et al.*, 1995; Ducrot 2001; Isaka *et al.*, 2009; **Figura 22**).

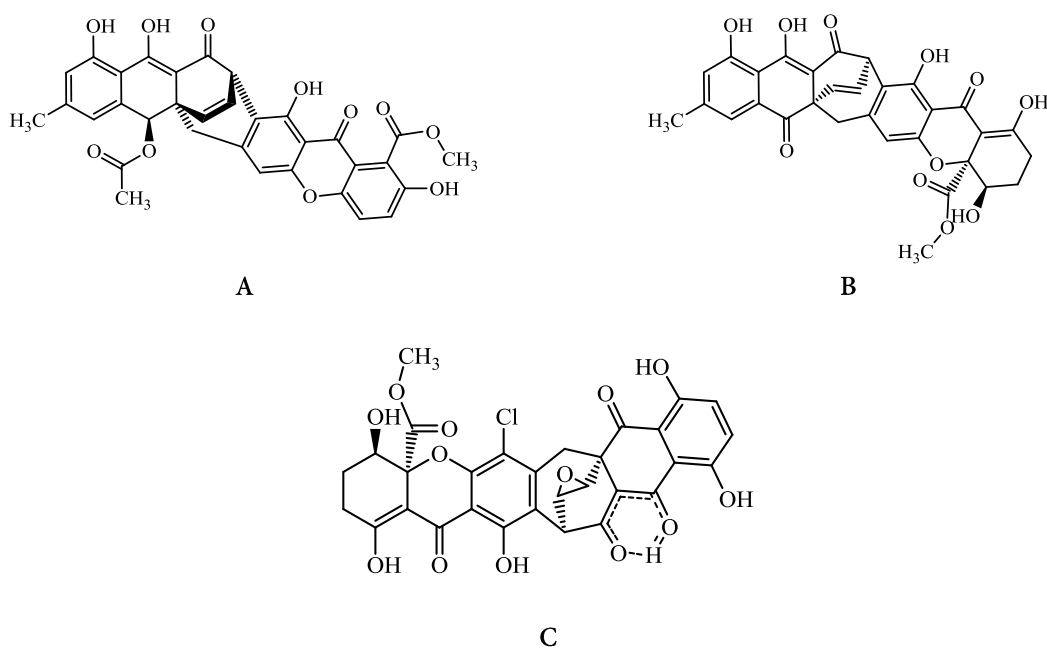


Figura 22. Núcleo general de A) las acremoxantonas, B) las xantoquinodinas y C) las beticolinas.

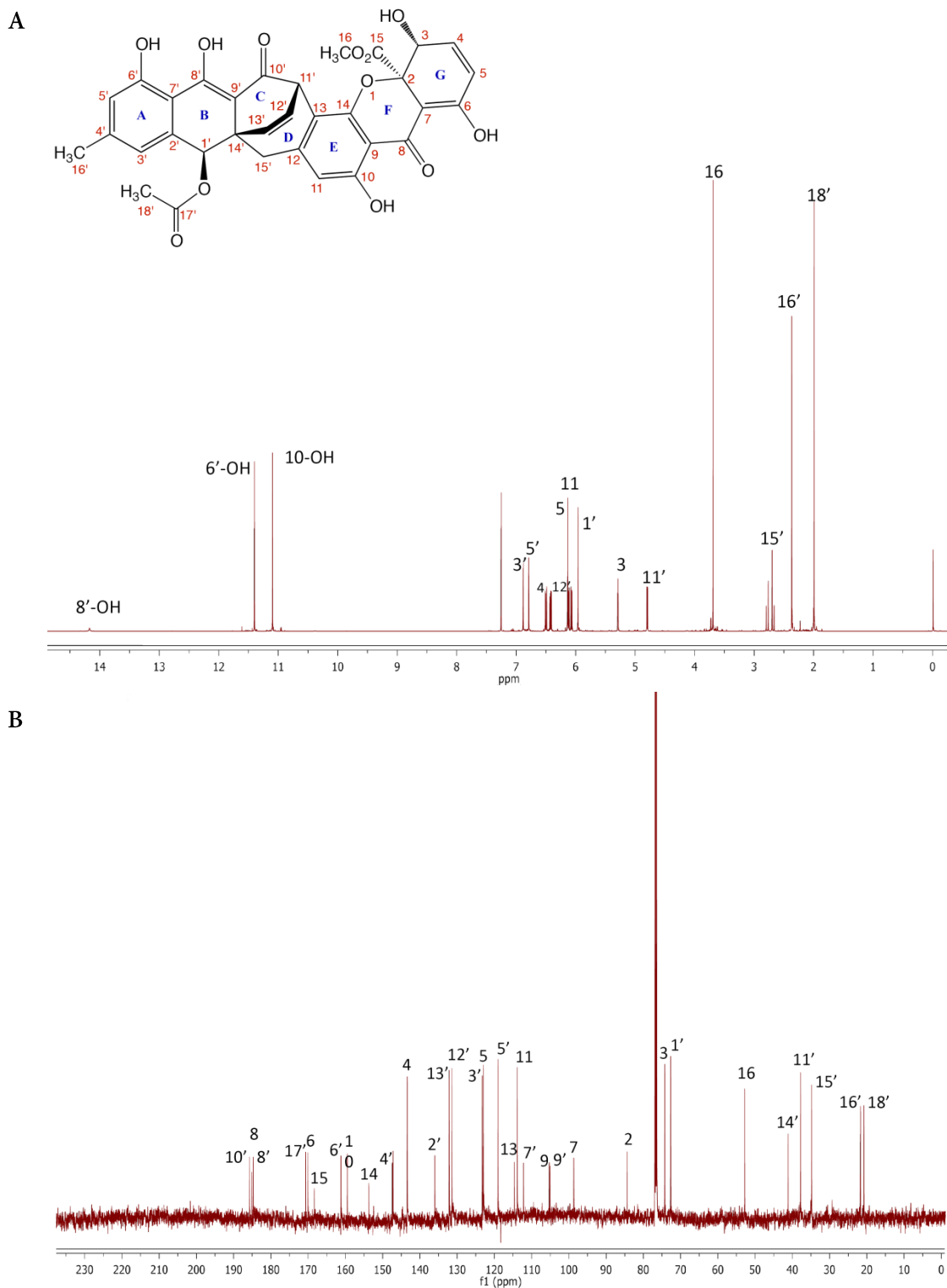


Figura 23. Espectro de (A) ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y (B) ^{13}C -RMN (500 MHz, CDCl_3) de la acremoxantona C (**122**) (125 MHz, CDCl_3).

De esta manera, la estructura de **122** está compuesta de un heterodímero, una parte antraquinona (anillos ABC) y una parte xantona (anillos EFG). Así, el anillo A de la antraquinona se estableció por la presencia de dos metinos *meta*-acoplados, H-5' y H-3', y las correlaciones en HMBC del -OH quelatado (δ_C 11.4, 6'-OH) con C-5', C-6' y C-7', y de los protones del metilo (δ_C 2.37, H-16') con los carbonos C-3', C-4' y C-5'; y del protón H-5' (δ_H 6.79) con C-6' y C-7'. La correlación débil a cuatro enlaces observada entre H-3' (δ_H 6.88) y el carbono en δ_C 185.6 sugiere que este carbono cuaternario (C-8') debe estar unido a C-7'. El anillo C está compuesto por una olefina (C-12'-C-13'), conectada a un metino (δ_C 38.27, C-11') y a un carbono cuaternario (δ_C 41.63, C-14'). Estos carbonos, junto con dos carbonos sp^2 en δ_C 186.27 (C-10') y δ_C 105.76 (C-9') forman el anillo de seis miembros. Esta conectividad está complementada por las correlaciones observadas en los experimentos COSY para el fragmento H-11'-H-12'-H-13', y HMBC entre el protón H-1' con C-2', C-3', C-7', C-13' y C-14' (Figuras 24 y 25).

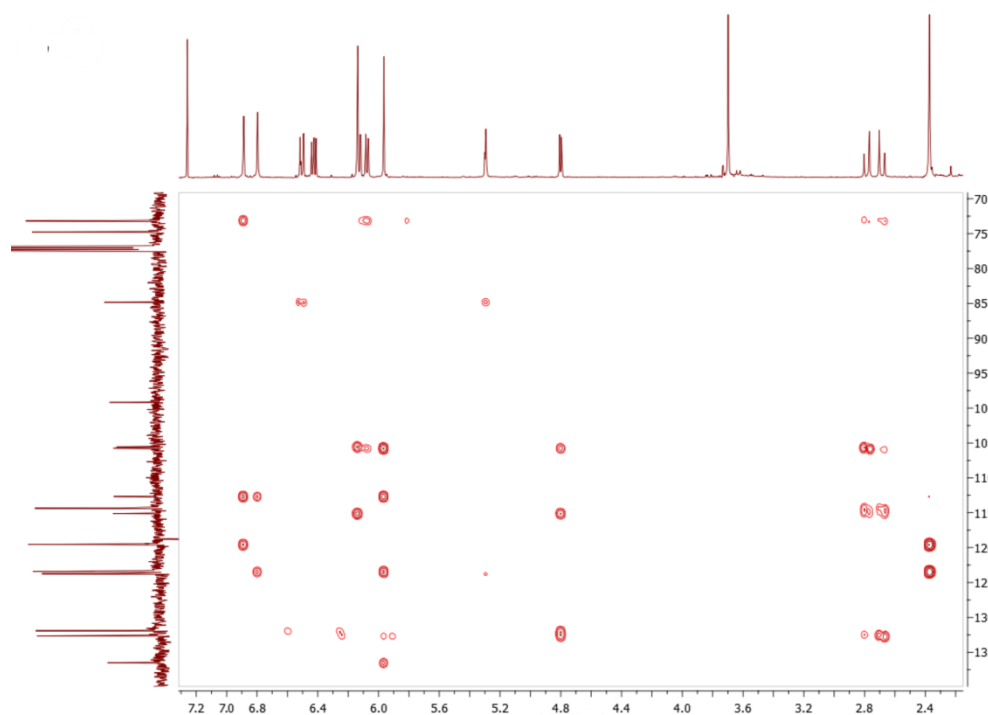


Figura 24. Espectro bidimensional HMBC de la acremoxantona C (**122**).

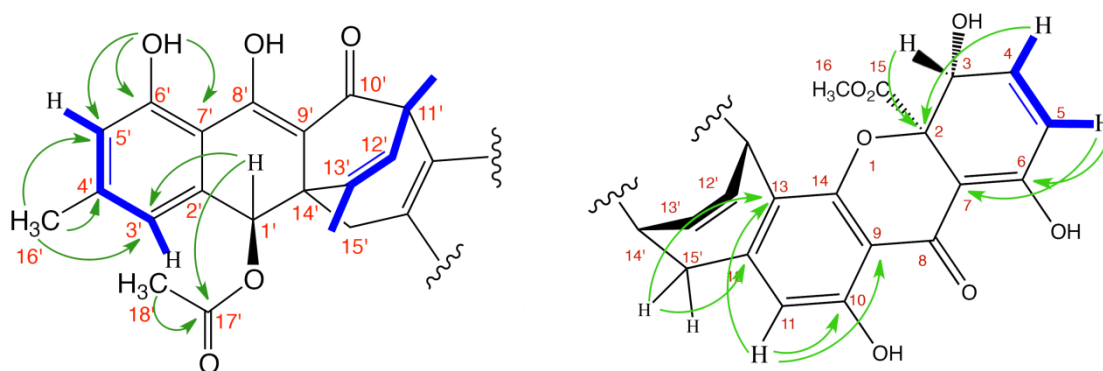


Figura 25 Correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales HMBC (flechas verdes) y COSY (líneas sólidas azules) para la acremoxantona C (**122**).

La porción de la estructura xantona (anillo EFG) se dedujo de las correlaciones HMBC. El anillo E fue asignado con las correlaciones en HMBC del $-\text{OH}$ quelatado (δ_{H} 11.1, 10-OH) con los carbonos C-9 y C-10; de H-11 con C-9, C-10 y C-13; así como de los protones no equivalentes del metileno (δ_{H} 2.68, 2.88, H-15') con C-11, C-12 y C-13. Al igual que en el anillo A de la estructura, se observaron correlaciones débiles a cuatro enlaces de H-11 con el carbono cuaternario en δ_{C} 185.23 (C-8) y C-6' que soporta el $-\text{OH}$ quelatado en δ_{H} 11.1, indicando la unión del carbonilo (C-8) con C-9. El resto de las señales en RMN protónica y carbono fueron asignadas para la porción G del anillo, el cual consiste de dos metinos *-orto* acoplados en δ_{H} 6.12 y δ_{H} 6.50 ($J = 10.3$ Hz). Las correlaciones observadas en HMBC para el H-5 con C-7 y C-6, así como de H-4 con C-6 y C-2, permitieron establecer el arreglo de los sustituyentes en el anillo G. La correlación de H-3 indica que el grupo $-\text{COOCH}_3$ se encuentra unido al carbono cuaternario sp^3 C-2. La unión entre las dos unidades tricíclicas se confirmó por las correlaciones observadas en HMBC de H-11' con C-13, C-12, C-10' y C-13'; de H-11 con C-11' y C-15' y de los protones H-15' con C-13, C-12, C-13' y C-14' (Figura 26).

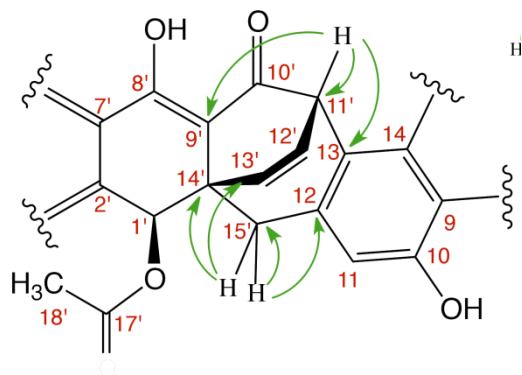


Figura 26 Correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales HMBC (flechas verdes) y COSY (líneas sólidas azules) para la acremoxantona C (**122**).

La elucidación de la acremoxidina A (**121**) se llevó a cabo con la comparación de los datos espectroscópicos previamente reportados (Isaka *et al.*, 2009). Una diferencia clave entre los espectros de la acremoxantona C (**122**) y la acremoxidina A (**121**) fue observada en el espectro de ^1H -RMN (**Figuras A1-A2**), en donde el número de señales fenólicas variaba de cuatro para **122** a seis para **121**.

La acremoxantona C (**122**) se describió recientemente como un metabolito novedoso de un hongo no identificado del orden Hypocreales. Sin embargo, la configuración absoluta de los centros estereogénicos C-2, C-3, C-1', C-11' y C-14' no se estableció. Los autores sólo asignaron la configuración relativa de C-1', C-2 y C-14' con base en las correlaciones observadas para los hidrógenos del grupo metilo del acetato C-18' y el protón en H-13' en un experimento ROESY. Los intentos por establecer la configuración absoluta en C-2 vía la preparación de un éster de Mosher fueron en vano, ya que en todos los casos, en las condiciones básicas utilizadas, ocurrió la apertura del anillo G para generar **121**. Como el producto presentó una excelente actividad anti-CaM (*vide infra*) se decidió completar la caracterización estructural del metabolito **122** mediante la determinación de la configuración absoluta en sus centros estereogénicos.

En el proceso de elucidación estructural de las moléculas orgánicas naturales, la determinación de la configuración absoluta (CA) de sus centros estereogénicos constituye uno de los retos más importantes. Durante décadas, muchas técnicas y aproximaciones se han

desarrollado para tal fin; algunos de estos métodos son directos (o absolutos), y otros indirectos. Los más exitosos pertenecen al primer grupo e incluyen difracción de rayos X, dicroísmo circular vibracional y electrónico, y actividad óptica en Raman. En los métodos indirectos, se emplean compuestos de referencia o derivados con centros asimétricos de configuración conocida; un ejemplo clásico de este grupo es la aplicación de la técnica de dicroísmo circular utilizando una serie de reglas empíricas como la del octante para establecer configuración absoluta en centros quirales de ciclohexanonas. La formación de derivados químicos de las moléculas quirales en estudio y su posterior análisis por RMN representa otra estrategia empírica exitosa de este segundo grupo. El ejemplo más conocido es la formación de ésteres de Mosher para determinar la configuración absoluta de carbinos secundarios (Kong y Wang 2013).

No obstante, en las últimas décadas, los métodos que emplean cálculos de modelado molecular para predecir parámetros estructurales, constituyen una herramienta importante en la elucidación de la configuración absoluta de los centros asimétricos de las moléculas quirales (Albadry *et al.*, 2013).

La predicción computacional de los desplazamientos químicos en ^{13}C -RMN se ha convertido en una herramienta popular para la asignación o reasignación estructural de productos naturales (Timmons *et al.*, 2008). Los cálculos para la determinación teórica de los parámetros de RMN han estado en constante desarrollo a lo largo de las últimas tres décadas, y aquellos basados en la mecánica cuántica representan una excelente aproximación, mejorando el poder analítico e interpretativo de las técnicas espectroscópicas más importantes (Autschbach 2014). El método de inclusión del cálculo de orbitales atómicos, GIAO, por sus siglas en inglés (gauge-including atomic orbital), es una de las aproximaciones más exitosas para el cálculo de los tensores de apantallamiento magnético nuclear, ya que se ha demostrado que provee resultados más precisos que aquellos obtenidos con otros cálculos que utilizan un mismo tamaño de conjunto de base (Cimino *et al.*, 2004). En síntesis, la comparación de un espectro experimental de RMN de una molécula orgánica compleja desconocida con un número de espectros calculados para estructuras

potenciales se ha convertido ya en una práctica común durante el proceso de elucidación estructural (Rotta *et al.*, 2010).

Así, los valores de constante de acoplamiento (J) son de gran valor para estudios conformacionales y estereoquímicos de moléculas orgánicas, proporcionando información de la geometría de la molécula. En particular, las constantes de acoplamiento entre los protones separados por tres enlaces (${}^3J_{\text{HH}}$) están directamente relacionadas con sus ángulos diedros a través de la ecuación de Karplus (Karplus 1959). De la misma manera, las constantes de acoplamiento vecinales heteronucleares (${}^3J_{\text{HC}}$, ${}^1\text{H} - {}^{13}\text{C}$) siguen una relación tipo Karplus y, por lo tanto, también se pueden emplear para medir variaciones angulares y, con ello, cambios estructurales adicionales. Los valores de J dependen del patrón de sustitución específico del segmento molecular en cuestión, y oscilan entre 0 y 16 Hz en el caso de ${}^3J_{\text{HH}}$ y de 0 a 9 Hz en el caso de ${}^3J_{\text{CH}}$.

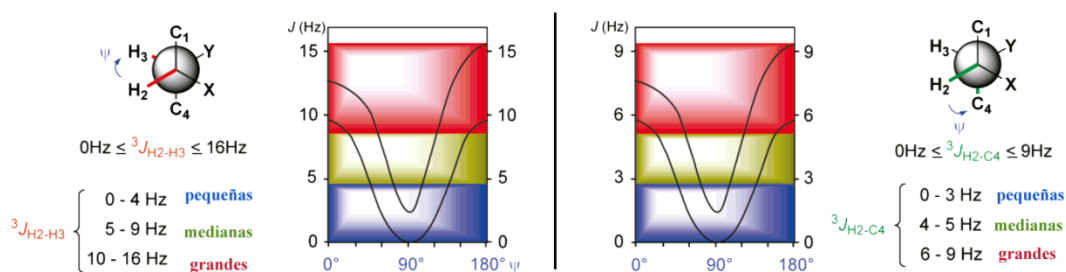


Figura 27. Estimación *a priori* de la magnitud de los valores de J en función del ángulo diedro ψ (grados) entre núcleos de interés. Tomado de Bifulco (2007).

De esta manera, considerando las proyecciones de Newman de un segmento estructural dado, la magnitud de cada J puede ser estimada *a priori* en todos sus posibles rotámeros con base en el ángulo diedro entre los núcleos de interés. Así, la configuración relativa de una estructura se puede deducir con base en la comparación de los valores de ${}^3J_{\text{HH}}$ y ${}^3J_{\text{CH}}$ medidas en los espectros apropiados con aquellos resultantes de cálculos teóricos.

De igual forma, se han desarrollado numerosos modelos para predecir el signo y la magnitud de los ángulos de rotación óptica (RO). Recientemente, métodos *ab-initio* así como

métodos de respuesta lineal dependientes de la frecuencia, se han empleado para calcular cuantitativamente valores de RO confiables. El cálculo del ángulo de RO específica procede del tensor de polarizabilidad del dipolo magnético y eléctrico (G'), el cual es una medida del traslape de la polarización electrónica inducida por los campos magnéticos y eléctricos de la radiación incidente. Desarrollos recientes incluyen la capacidad para calcular este tensor G' en estaciones de trabajo estándares. De ésta manera, los métodos *ab-initio* combinados bajo diversas estrategias se han implementado para asignar configuraciones relativas y absolutas de los centros estereogénicos de productos naturales de alta complejidad (Kondru *et al.*, 1999; Bicker *et al.*, 2009).

Para fines de este trabajo, se decidió llevar a cabo el cálculo teórico de la rotación óptica específica, así como el cálculo de las constantes de acoplamiento ($^3J_{C,H}$ y $^3J_{H,H}$), con el fin de compararlas con sus correspondientes parámetros observados en un experimento de 1H y ^{13}C totalmente acoplado.

6.1.1 Cálculos de modelado molecular para la determinación de la configuración absoluta en los centros estereogénicos de 122

El cálculo de rotación óptica específica ($[\alpha]_D$) se llevó a cabo usando métodos computacionales descritos en diferentes trabajos reportados en la literatura (Leyte-Lugo *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2009). La acremoxantona C presenta cinco carbonos asimétricos: C2, C3, C1', C11' y C14', por lo tanto se pueden construir hasta 16 posibles estereoisómeros en dos diferentes series enantioméricas (α y β), ya que el puente entre C-11' y C-14' sólo puede estar α - o β -orientado. La estructura para cada miembro de ambas series se construyó y minimizó mediante el programa Spartan'02. La búsqueda conformacional se realizó empleando un campo de fuerza MMFF94, seguida de la optimización geométrica de cada conformero utilizando teoría de funcionales de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP con el programa Gaussian 03 (Figura 28).

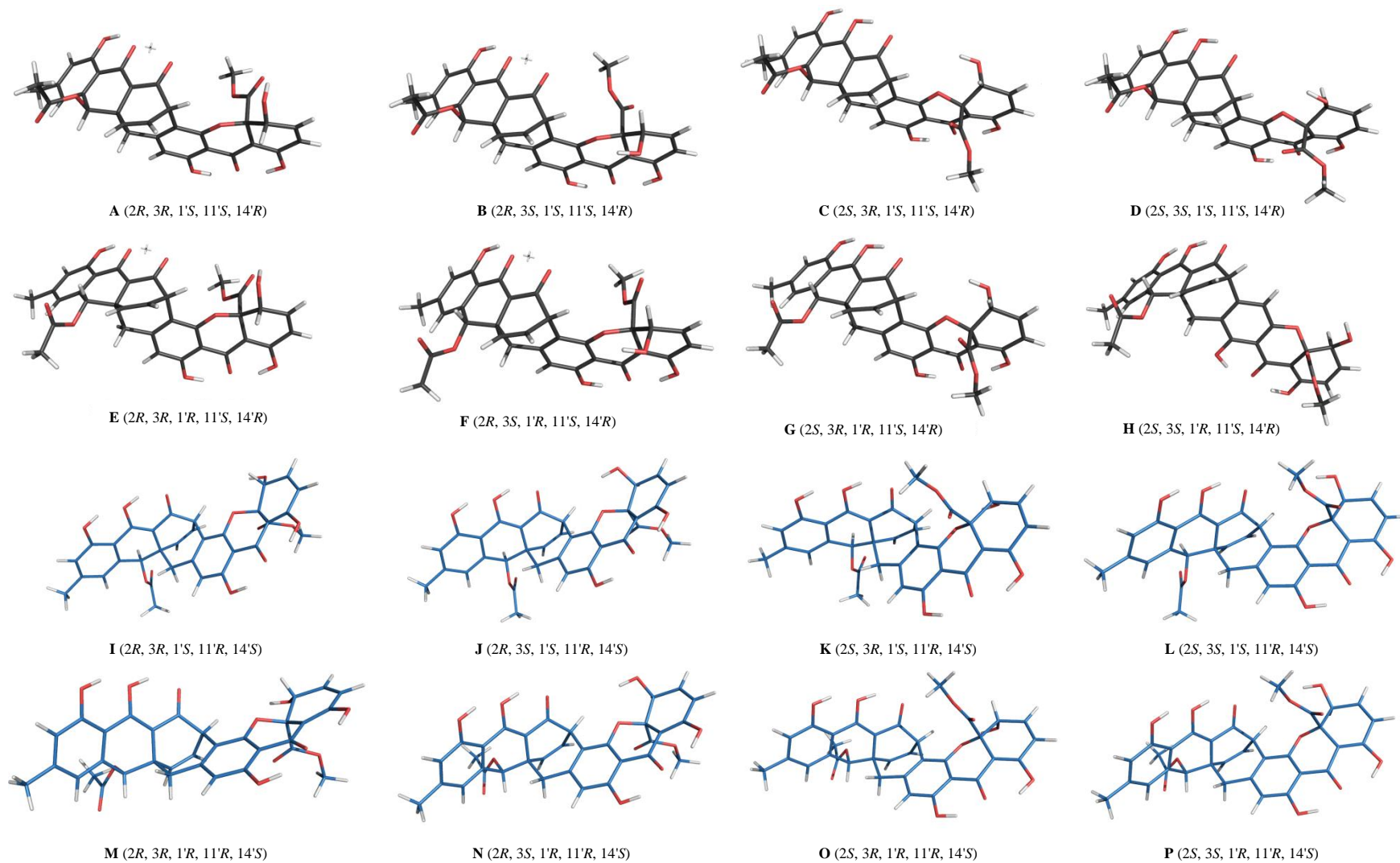


Figura 28. Modelos de mínima energía global obtenidos por DFT B3LYP/DGDZVP para los ocho posibles estereoisómeros correspondientes a las series enantioméricas α (A- H, bastones negros) y β (I- P, bastones azules) de 122.

Un análisis detallado de cada una de las estructuras de mínima energía permitió descartar las moléculas duplicadas. Para cada uno de los diastereoisómeros se obtuvieron entre ocho y once conformeros de mínima energía, seleccionados a partir del valor energético que presentaron (0 – 3 kcal/mol) y, con los cuales, posteriormente se calcularon los valores de rotación óptica específica ($[\alpha]_D$). En las tablas 5 y A1 – A9 (ver Anexo) se muestran los valores teóricos de energía libre (ΔG), población (P), valores de ángulos diedros y $[\alpha]_D$ para cada una de las estructuras analizadas.

Tabla 5. Valores calculados de $[\alpha]_D$ para los ocho estereoisómeros de la acremoxantona C (122) de la serie enantiomérica β (11'S, 14'R).

Estereoisómero	Configuración Absoluta	Conformeros	$[\alpha]_D$	Diferencia vs Experimental (%)
A	2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R	5	+467.22	12.9
B	2R, 3S, 1'S, 11'S, 14'R	5	+715.91	33.3
C	2S, 3R, 1'S, 11'S, 14'R	5	+638.69	18.9
D	2S, 3S, 1'S, 11'S, 14'R	4	+680.79	26.8
E	2R, 3R, 1'R, 11'S, 14'R	5	+425.4	20.8
F	2R, 3S, 1'R, 11'S, 14'R	5	+716.34	33.4
G	2S, 3R, 1'R, 11'S, 14'R	2	+446.56	16.8
H	2S, 3S, 1'R, 11'S, 14'R	3	+624.79	16.4

$[\alpha]_D$ experimental: +537.0

Una vez ponderados los resultados, se encontró que sin importar la configuración absoluta de los centros C-2, C-3 y C-1', los ocho estereoisómeros de la serie β (11'S, 14'R) tenían valores de $[\alpha]_D$ positivos (Tabla 5), mientras que aquellos de la serie α (11'R, 14'S) presentaron valores negativos (Tabla A9). Cabe destacar, que todos los heterodímeros xantona-antraquinona hasta ahora reportados poseen un puente de dos carbonos β - orientado entre C-11'-C-14', así como

valores positivos de $[\alpha]_D$, denotando entonces que la biosíntesis de este tipo de compuestos parece estar restringida a isómeros con dicho puente β - orientado (Tabata *et al.*, 1996; He *et al.*, 2005; Isaka *et al.*, 2009). Los valores de la rotación óptica específica calculada para los estereoisómeros de la serie β se compararon con el valor experimental obtenido para **122** y se presentan en la Tabla 5. De acuerdo con los resultados presentados en esta tabla, el valor calculado de $[\alpha]_D$ para el isómero A es el que mejor corresponde con el valor experimental registrado para el producto natural (+537.0°). Este hallazgo también implica que la configuración absoluta en los centros C-2, C-3, C-1', C-11', y C-14' serían R, R, S, S, y R, respectivamente. Además, las fuertes correlaciones observadas en el espectro NOESY entre H-1' y los dos hidrógenos H-15' [α (distancia = 2.86 Å) y β (distancia = 2.44 Å)] de **122**, proporcionan una evidencia adicional para sugerir que la configuración absoluta en el carbono C-1' es S, descartando entonces los estereoisómeros E-H (Figura 29).

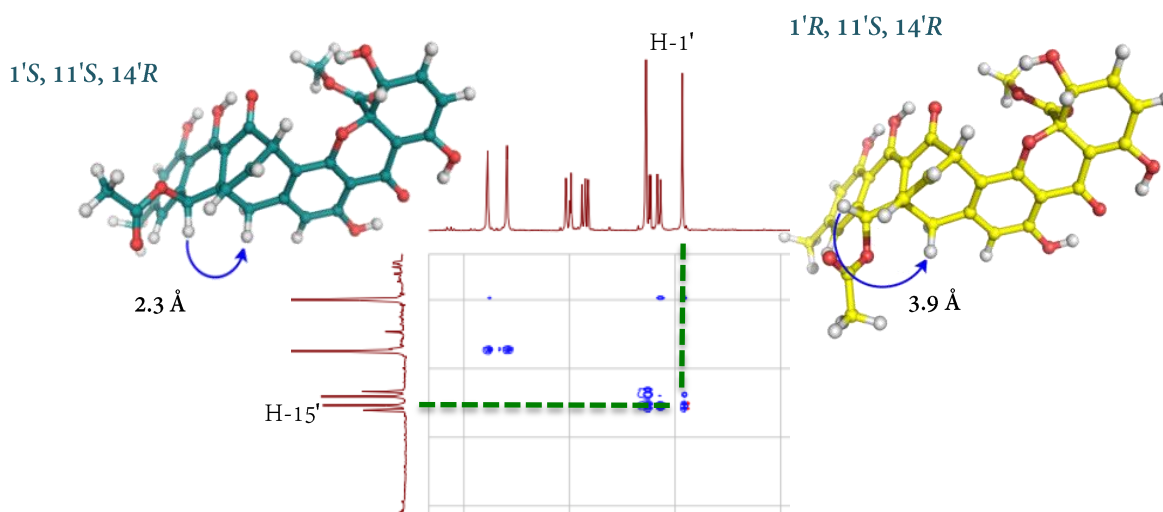


Figura 29. Modelos de mínima energía (DFT B3LYP/DGDZVP) para los estereoisómeros A y E de **122**, con un fragmento del espectro del experimento bidimensional NOESY mostrando la correlación entre los protones H-1' y H-15'.

A continuación, se llevó a cabo el cálculo de las constantes de acoplamiento en RMN, con el fin de hacer la comparación con las constantes generadas en un experimento de ^1H y uno de ^{13}C totalmente acoplado a protón. Este último estudio permite determinar de manera más específica la

configuración absoluta de un centro asimétrico, pues pequeños cambios en ángulos diedros determinados provocan diferencias significativas en el valor de las constantes de acoplamiento 3J (C-C-C-H). El cálculo de dichas constantes, se centró en los centros asimétricos sobre los carbonos C2, C3 y C1'.

El experimento se llevó a cabo con 20 mg de muestra por un periodo de 24 h, en donde el acoplador de hidrógeno se mantuvo en funcionamiento mientras se adquirió el espectro de ${}^{13}\text{C}$ -RMN. El resultado es un espectro de ${}^{13}\text{C}$ en donde se pueden apreciar los acoplamientos a dos y tres enlaces de distancia (${}^3J_{\text{H-C-C-H}}$, ${}^3J_{\text{C-C-C-H}}$) de cada carbono con los protones vecinales. De esta manera, los valores experimentales para ${}^3J_{\text{C,H}}$ (${}^3J_{\text{C-7,H-3}}$, ${}^3J_{\text{C-7,H-5}}$ y ${}^3J_{\text{C-15,H-3}}$) y ${}^3J_{\text{H,H}}$ (${}^3J_{\text{H-3,H-4}}$) se midieron en espectros de ${}^{13}\text{C}$ -RMN totalmente acoplado (**Figura 30**) y ${}^1\text{H}$, respectivamente

El cálculo de las constantes de acoplamiento se llevó a cabo con el mismo método (DFT) y nivel de teoría (B3LYP/DGDZVP) que para el análisis de RO, mediante la sumatoria de valores de cada conformero en función de la fracción molar (Cerde-García-Rojas y Pereda Miranda, 1999) (Tablas A10 – A17). Finalmente, se realizó un análisis comparativo entre las constantes de acoplamiento teóricas y las experimentales empleando el estadístico del error medio cuadrático (EMC).

En este caso, el análisis comparativo fue sólo realizado para los estereoisómeros **A-D**, que presentaban el puente del biciclo en posición β , así como una distancia apropiada entre los protones H-1' y H-15' (α y β) para observar una interacción en el espectro NOESY. Una vez más, la mejor correlación entre los valores teóricos y experimentales se observó para el estereoisómero **A** (2*R*,3*R*,1'*S*,11'*S*,14'*R*), descartando las estructuras **B-D** para la acremoxantona **C** (**122**; Tabla 6).

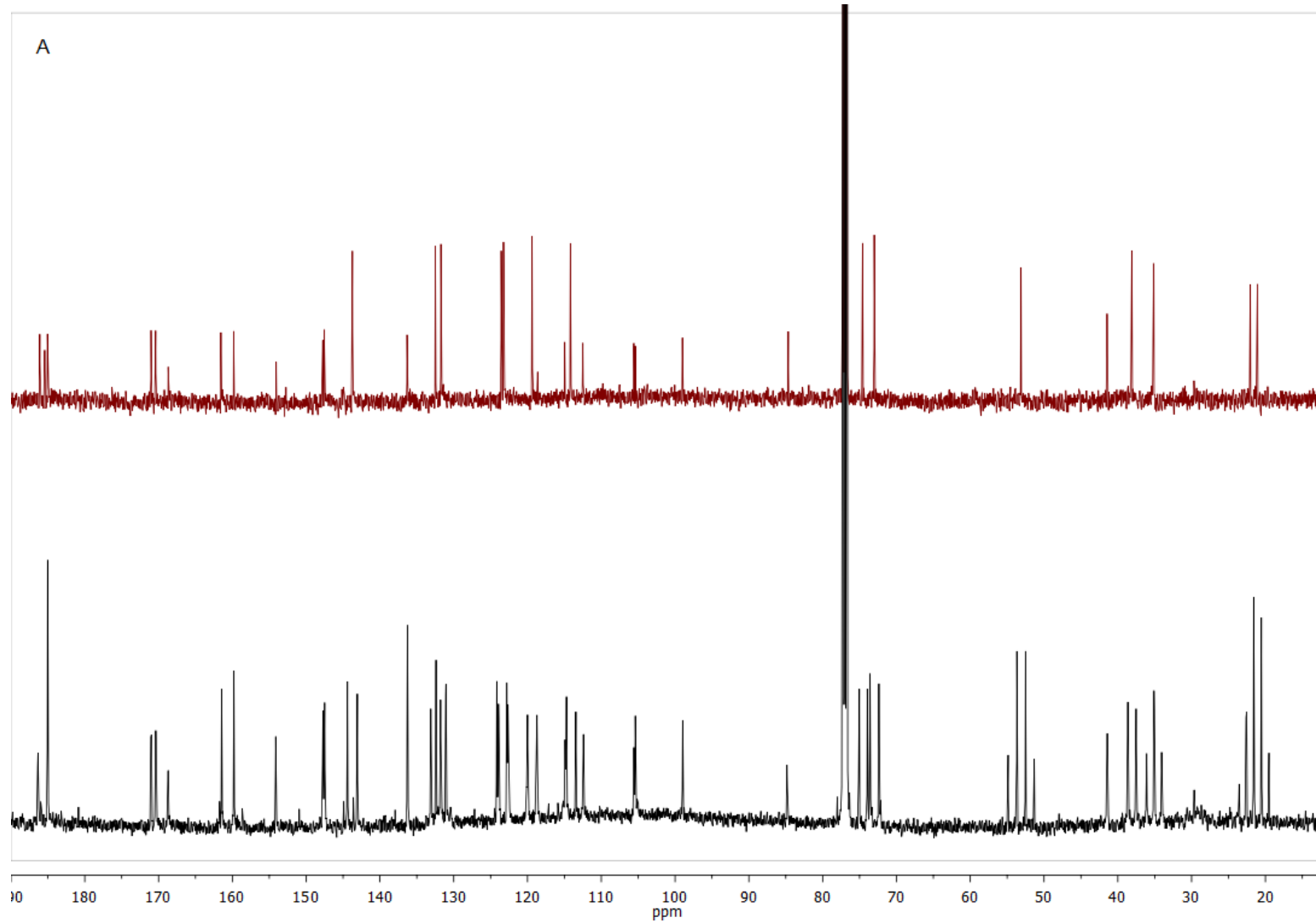


Figura 30. Espectro de ^{13}C -RMN totalmente acoplado a protón de 122 (A), superpuesto con un experimento de ^{13}C -RMN desacoplado (B).

Así, en el espectro de ^{13}C -RMN totalmente acoplado de **122** (Figura 30), C-7 ($\delta = 99.1$ ppm) apareció como un doblete ancho con $^3J_{\text{C-7,H-3}} \approx 1.5$, $^3J_{\text{C-7,H-5}} = 3.9$ Hz y el carbono del carbonilo (C-15) se observó como un doble cuarteto con $^3J_{\text{C-15,H-3}} = 7.6$ Hz y $^3J_{\text{C-15,H-16}} = 3.3$ Hz en concordancia con los valores calculados para el isómero **A**. Además, el valor de $^3J_{\text{H-3,H-4}}$ de 2.1 Hz observado en el espectro de ^1H -RMN de **122**, provee evidencia adicional a favor de la estereoestructura **A**, en donde el valor teórico de $^3J_{\text{H-3,H-4}}$ fue de 2.5 Hz. En el caso de los isómeros **B** y **C** los valores de las constantes calculadas $^3J_{\text{H-3,H-4}}$ fueron de 6.0 y 6.2 Hz, con una desviación cuadrática media (RMSD) de 15.21 y 16.81, respectivamente, demostrando una geometría diferente en el fragmento diedro H-3-C-3-C-4-H-4.

Tabla 6. Comparación entre acoplamientos selectos de ^1H - ^{13}C y ^1H - ^1H experimentales y calculados (DFT) para los diastereoisómeros **A-D** de la acremoxantona **C** (**122**).

Fragmento Diedro	Exp	Calc $^3J_{\text{X,Y}}^b$	Calc $^3J_{\text{X,Y}}^b$	Calc $^3J_{\text{X,Y}}^b$	Calc $^3J_{\text{X,Y}}^b$
X-C-C-Y	$^3J_{\text{X,Y}}^a$	para A (ECM) ^c	para B (ECM) ^c	para C (ECM) ^c	para D (ECM) ^c
C7-C2-C3-H3	1.5	2.0 (0.25)	4.9 (11.56)	4.9 (11.56)	2.1 (0.36)
C15-C2-C3-H3	7.6	8.4 (0.64)	3.3 (18.49)	3.2 (19.36)	9.2 (2.56)
H3-C3-C4-H4	2.1	2.5 (0.16)	6.0 (15.21)	6.2 (16.81)	3.1 (1.0)
	RMSD ^d	0.59	3.88	3.99	1.14

^aEn Hz, medidos en un experimento de ^{13}C -RMN totalmente acoplado, o ^1H -RMN. ^bCalculado a partir de las estructuras optimizadas (DFT, B3LYP/DGDZVP). ^cError cuadrático medio. ^dDesviación cuadrática media.

De manera adicional, la gran diferencia entre los valores experimental ($^3J_{\text{C-15,H-3}} = 7.6$ Hz) y calculado para los estereoisómeros **B** ($^3J_{\text{C-15,H-3}} = 3.3$ Hz) y **C** ($^3J_{\text{C-15,H-3}} = 3.2$ Hz), así como entre los valores experimental y teórico para el estereoisómero **D** ($^3J_{\text{C-15,H-3}} = 9.2$ Hz) refuerza la selección de **A** como la estructura correcta para la acremoxantona **C** (**122**).

6.1.2 Evaluación de la actividad anti-CaM de los compuestos 121 y 122 con el biosensor de CaM *hCaMM124C-mBBr*

Una vez caracterizados por completo ambos metabolitos fúngicos, se evaluó la afinidad de **121** y **122** por la calmodulina usando el biosensor fluorescente *hCaMM124C-mBBr*, de tal manera que al titular la proteína marcada con los compuestos, se produjo un apagamiento de la fluorescencia debida al cambio conformacional de la misma. Con los resultados del experimento se construyeron las curvas de titulación de fluorescencia (λ_{ex} 381 nm; λ_{em} 415–550 nm).

El resultado de la evaluación de **121** y **122** indicó que ambos productos interaccionan directamente con la proteína de manera dependiente de la concentración. De los espectros de emisión obtenidos (**Figura 31**), se tomaron los valores de los máximos y se graficaron contra la relación $\text{Compuesto}/\text{Proteína}_{\text{Total}}$, para generar una gráfica a partir de la cual se calculó la constante de disociación (K_d). Los resultados obtenidos demostraron que la acremoxantona C (**122**) y la acremonidina A (**121**) tienen constantes de disociación de 18.25 ± 3.01 y 19.40 ± 3.15 nM, respectivamente, y una estequiometria de 1:1. Estos valores representan una alta afinidad por la CaM, cerca de setenta veces más que la clorpromazina (CPZ, $K_d = 1.24 \mu\text{M}$), un inhibidor clásico de CaM bien caracterizado y usado como control positivo en este experimento.

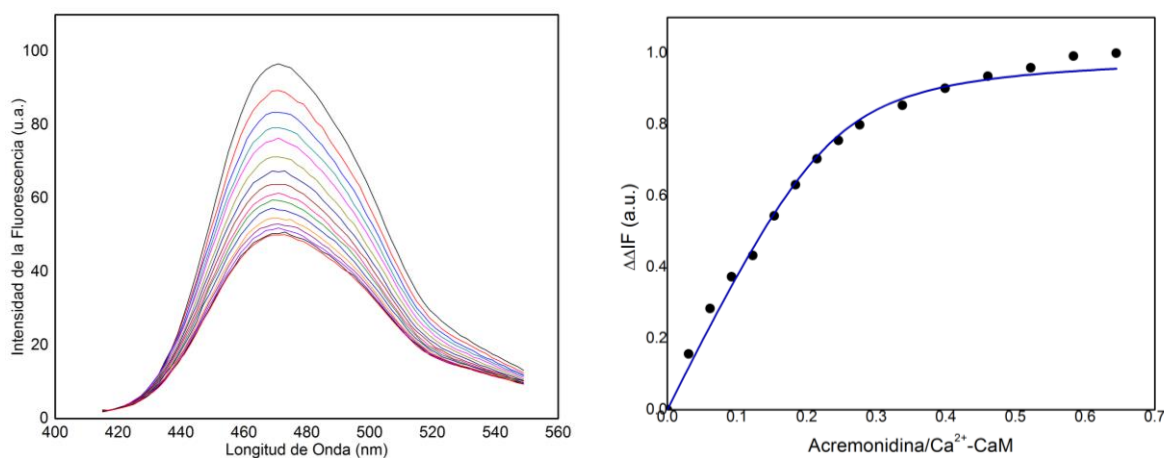


Figura 31a. A) Curva de titulación con **121** y espectro de fluorescencia de *hCaMM124C-mBBr* (5 μM) a saturación con Ca²⁺ (10 mM). B) Ajuste de los máximos de absorción para la determinación de K_D .

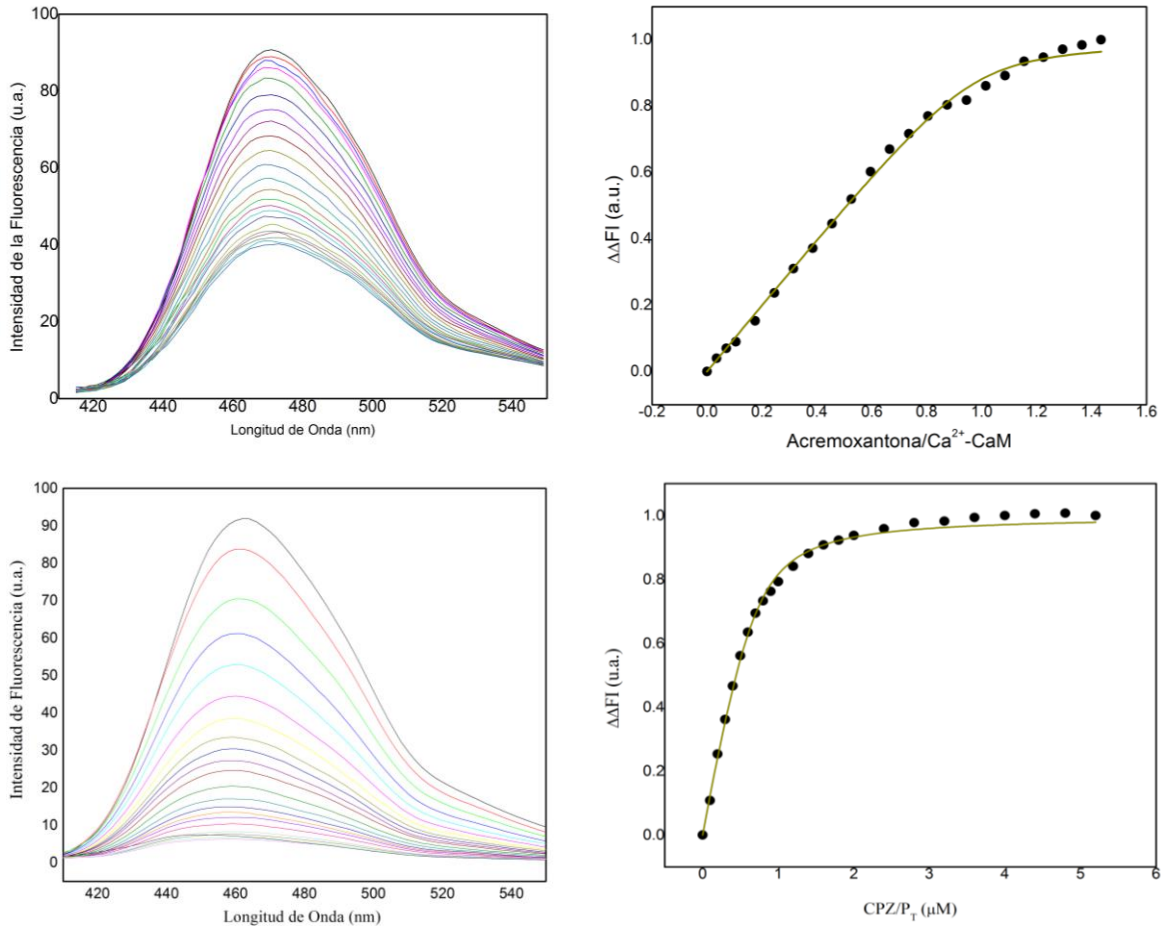


Figura 31b. Curvas de titulación y espectro de fluorescencia de *hCaMM124C-mBBr* de C) **122** y D) CPZ. Ajuste de los máximos de absorción para la determinación de K_D de E) **122** y F) CPZ.

Los productos **121** y **122** apagaron la fluorescencia del biosensor en un grado similar (47 y 48%, respectivamente), mientras que la CPZ apagó la fluorescencia en un grado mayor (60%). El nivel de afinidad observados para **121** y **122** es inusual, ya que la mayoría de los antagonistas de CaM se unen a la proteína con menor afinidad, comúnmente en el orden micromolar (Figuroa *et al.*, 2009; Leyte-Lugo *et al.*, 2012).

A continuación, con el objetivo de predecir el probable sitio de unión a CaM de **121** y **122**, se llevó a cabo un estudio teórico de acoplamiento usando el programa AutoDock 4.2. El “docking” de ambos productos fúngicos con la estructura co-cristalizada de Ca^{2+} -CaM con la trifluoroperazina (código PDB 1A29) sugirió una interacción de tipo no clásica, es decir, el sitio de

unión resultó diferente al de la CPZ o TFP (**Figura 32**). Las constantes de inhibición predichas por el programa fueron de $K_i = 367.6$ y 406.9 nM para **121** y **122**, respectivamente.

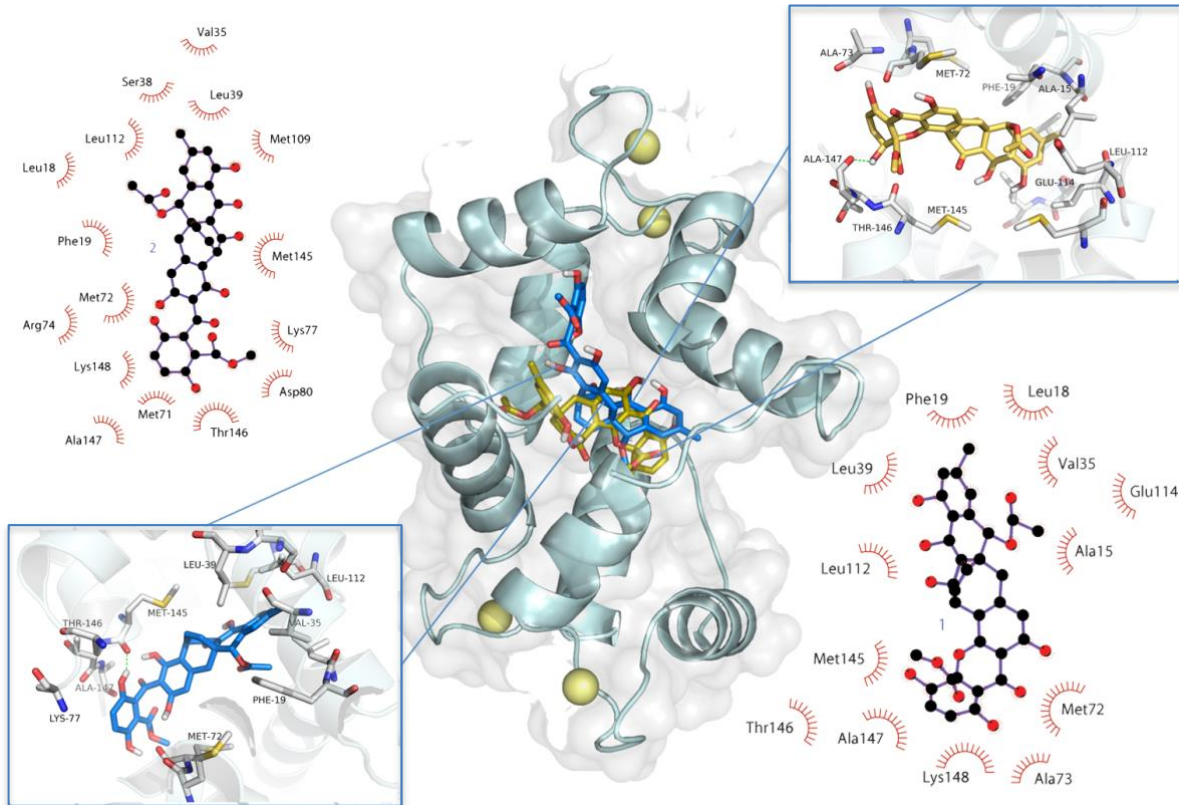


Figura 32. Modelo estructural de los complejos de (listones azul claro). El panel central muestra la interacción de **121** (bastones azules) y **122** (bastones amarillos) con la CaM (código PDB 1XA5). Detalles acerca del modo de unión, los aminoácidos involucrados (bastones blancos) se muestran en los paneles laterales. Imagen diseñada y editada con PyMOL y LigPlus⁺.

El sitio de unión propuesto para **121** y **122** fue similar al del KAR-2, un agente antitumoral derivado de vinblastina que se una a la CaM en un sitio entre los dominios globulares N- y C-terminal (Horvaht *et al.*, 2005), tal como **121** y **122** lo hacen (**Figura 33**). Al igual que KAR-2, parece que ambos metabolitos fúngicos interactúan con varios residuos de aminoácido en común, principalmente hidrofóbicos, incluyendo la Phe19, Ala15, Val35, Leu39, Gln41, Phe68, Ala73, Phe92, Met109, Leu112, Glu114, y Thr146; además, **122** forma un enlace de hidrógeno entre la

Met145 y el 3-OH (distancia = 3.8 Å). Ambos tipos de interacción (hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno) juegan un papel importante en la estabilización del complejo proteína-ligando.

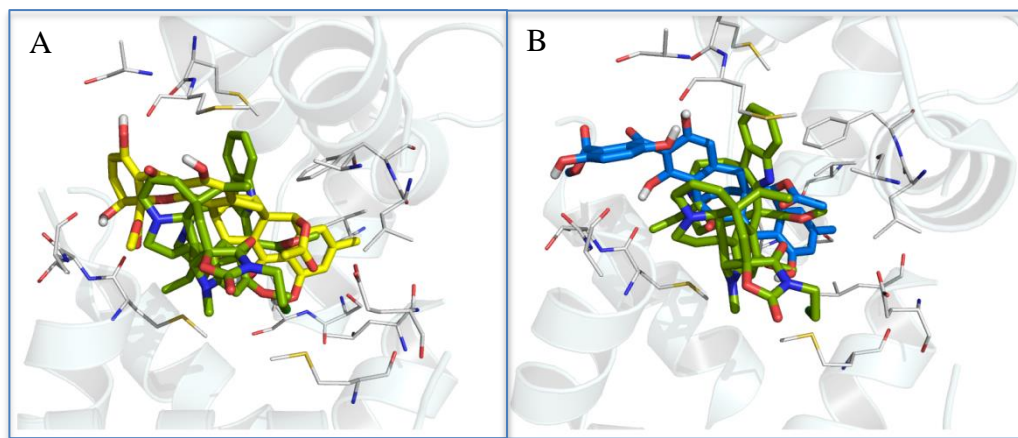


Figura 33. Sitio de interacción modelado para A) **122** (bastones amarillos), B) **121** (bastones azules) con la CaM (pdb 1XA5), en ambos casos se superpone con el KAR-2 (bastones verdes).

Debido al modo inusual de unión a CaM que sugieren los estudios de acoplamiento, la afinidad de **122** hacia la CaM se midió ahora usando el biosensor *hCaMT110C-mBBr*, concebido para la detección de inhibidores no clásicos de la CaM (**Figura 34**). Este dispositivo se generó siguiendo una estrategia convencional que comprende mutagénesis sitio-dirigida para reemplazar el residuo estratégico Thr110Cys, seguido de un marcaje específico del grupo reactivo tiol con el fluoróforo *mBBr*. Esta posición se seleccionó tomando en consideración que el residuo 110 de CaM está en un área superficial accesible ($ASA = 50.17 \text{ \AA}^2$) en la estructura α -hélice de la CaM, lejos del sitio de unión de los inhibidores clásicos, y que además no involucra la unión a Ca^{2+} . La eficiencia cuántica del dispositivo *hCaMT110C-mBBr* fue de $\phi = 0.303$.

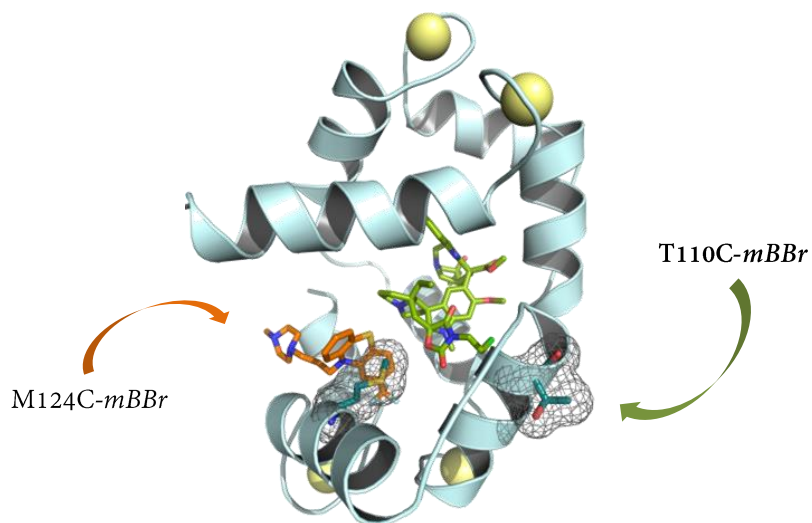


Figura 34. Esquema comparativo entre las posiciones marcadas M124 y T110 de la proteína calmodulina (pdb 1a29) para los biosensores *hCaMM124C-mBBr* y *hCaMT110C-mBBr*, respectivamente. Se hace la comparación con las estructuras modeladas de la TFP (bastones naranja,) y KAR-2 (bastones verdes)

Las curvas de titulación con el biosensor fluorescente se construyeron adicionando concentraciones saturantes de **122** y CPZ (3.1 y 7.1 μM , respectivamente) en presencia de Ca^{2+} (10 mM). Las gráficas correspondientes se presentan en la **Figura 35**.

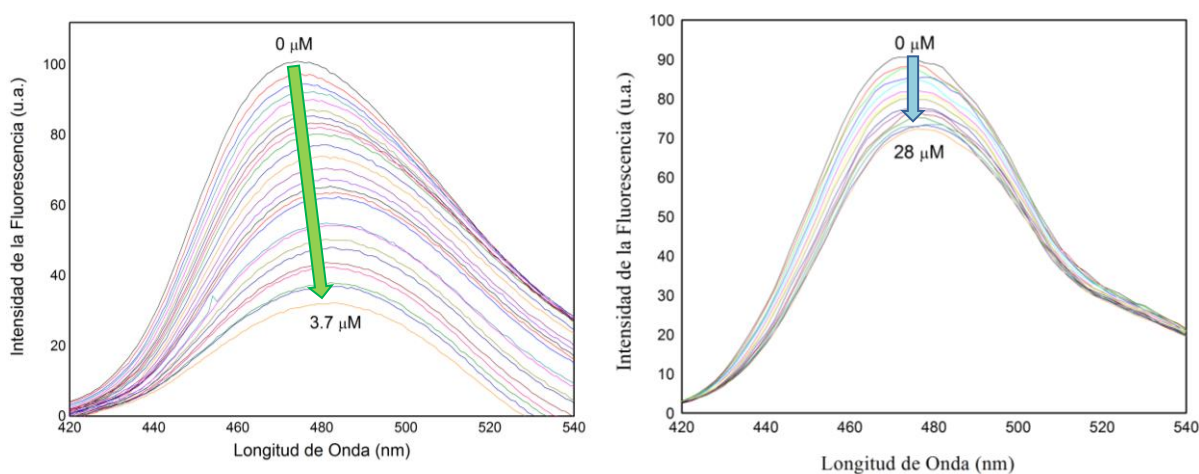


Figura 35. Curvas de titulación de *hCaMT110C-mBBr* (5 μM , Ca^{2+} 10 mM) a saturación. (A) **122**, 63% de apagamiento, (B) CPZ, 20% de apagamiento.

El apagamiento de la fluorescencia fue de 63 y 20 % para la acremoxantona C (**122**) y CPZ, respectivamente. Además, el cambio en el máximo de fluorescencia a longitudes de onda elevadas (fenómeno conocido como *redshift*) se observó sólo para el compuesto **122** (Lakowicz 2006). El mayor porcentaje de apagamiento y el desplazamiento en los máximos de fluorescencia causados por **122**, en comparación con la CPZ, revelan que el metabolito de origen fúngico se une a la proteína en un sitio diferente al sitio de los inhibidores clásicos. Estos resultados proporcionan una evidencia experimental al modo no clásico de unión que permite proponer el análisis de acoplamiento molecular.

Los ligantes que interaccionan en un dominio novedoso pueden modular selectivamente las propiedades reguladoras de la CaM. En este sentido, Horváth y colaboradores demostraron mediante la cristalización del complejo Ca^{2+} -CaM-KAR-2 que el fármaco interactúa con una región constituida por residuos de aminoácido de ambos dominios globulares de la CaM (C-terminal y N-terminal). Los autores proponen que ésta característica le confiere al KAR-2 su especificidad como agente anti-microtubular, permitiendo a la CaM interactuar con la mayoría de sus blancos fisiológicos. En consecuencia, los efectos tóxicos de esta familia de antitumorales se encuentran reducidos en el KAR-2 (Horváth *et al.*, 2004).

6.2 Obtención y caracterización de los metabolitos activos de *Isaria fumosorosea* (sinonimia *Paecilomyces fumosoroseus*)

Con el objetivo de obtener rendimientos óptimos en los extractos fúngicos, se estudiaron dos diferentes medios de cultivo y dos condiciones de crecimiento. Cabe mencionar que la Dra. Toriello proporcionó dos cepas del mismo hongo, las cuales diferían en el nivel de virulencia que presentan para la mosquita blanca. Las condiciones, así como los rendimientos de sus extractos orgánicos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Rendimientos para *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo y condiciones.

		Cepa	
		EH-503/3	EH-511/3*
Medio	PDB (estático)	37.3 mg/150 mL	89.6 mg/150 mL
	PDB (agitación)	15.1 mg/150 mL	22.4 mg/150 mL
	Arroz	218.3 mg/30g	290.1 mg/30g

*Cepa de mayor virulencia.

Los mejores rendimientos se observan con el medio de arroz para la cepa EH-511/3, por lo que para el subsecuente estudio químico de este hongo, se decidió cultivarlo en mediana escala bajo estas condiciones. Tanto el extracto orgánico total, como la fracción FPfII-s obtenida por fraccionamiento preliminar del extracto íntegro como se describió en la sección experimental, demostraron actividad en el ensayo de apagamiento (45 y 50%, respectivamente) de la fluorescencia del biosensor *hCaMM124C-mBBr*.

Para caracterizar los metabolitos presentes la fracción FPfII-s, se llevó a cabo un análisis por medio de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia en fase reversa acoplada a espectrometría de masas (CLUE-EM). El cromatograma (Conteo Total de Iones) se muestra en la **Figura 36**.

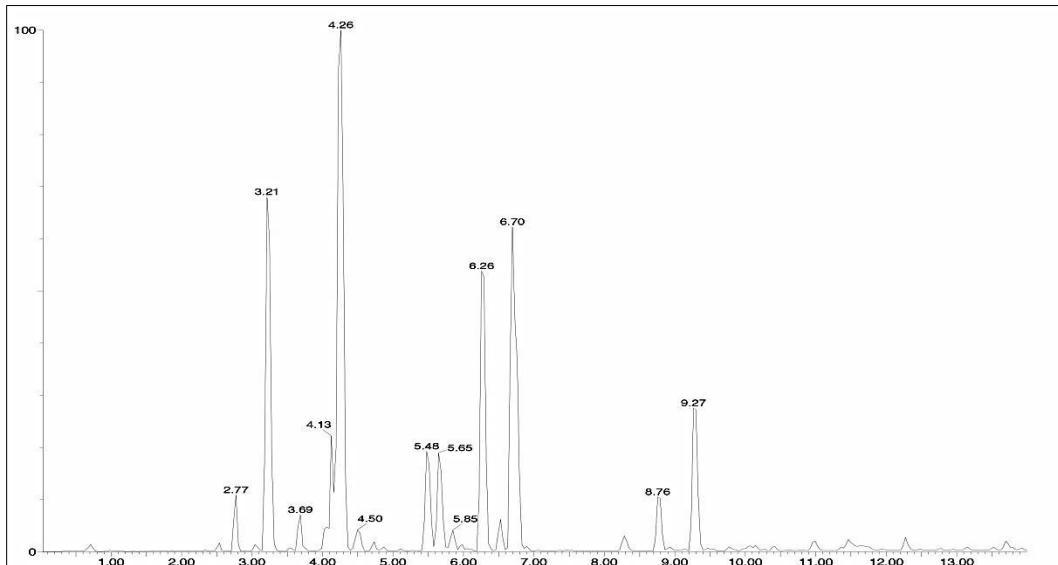


Figura 36 Cromatograma obtenido por la técnica CLUE-EM para la fracción FPfII-s del extracto orgánico de *I. fumosorosea*.

El análisis por espectrometría de masas (electrospray) de los productos más abundantes que se observaron en el cromatograma permitió la identificación de los metabolitos correspondientes (**Figura 37**). De tal forma, que se logró caracterizar nueve ciclotetradepsipéptidos, las beuverólidas N (**118**), M (**117**), I (**115**), P (**119**), L(**112**), J_a (**116**), F (**114**), K_a (**123**) y C (**113**). Los resultados se resumen en la Tabla 8. La estructura general de estos productos se presenta en la **Figura 38**.

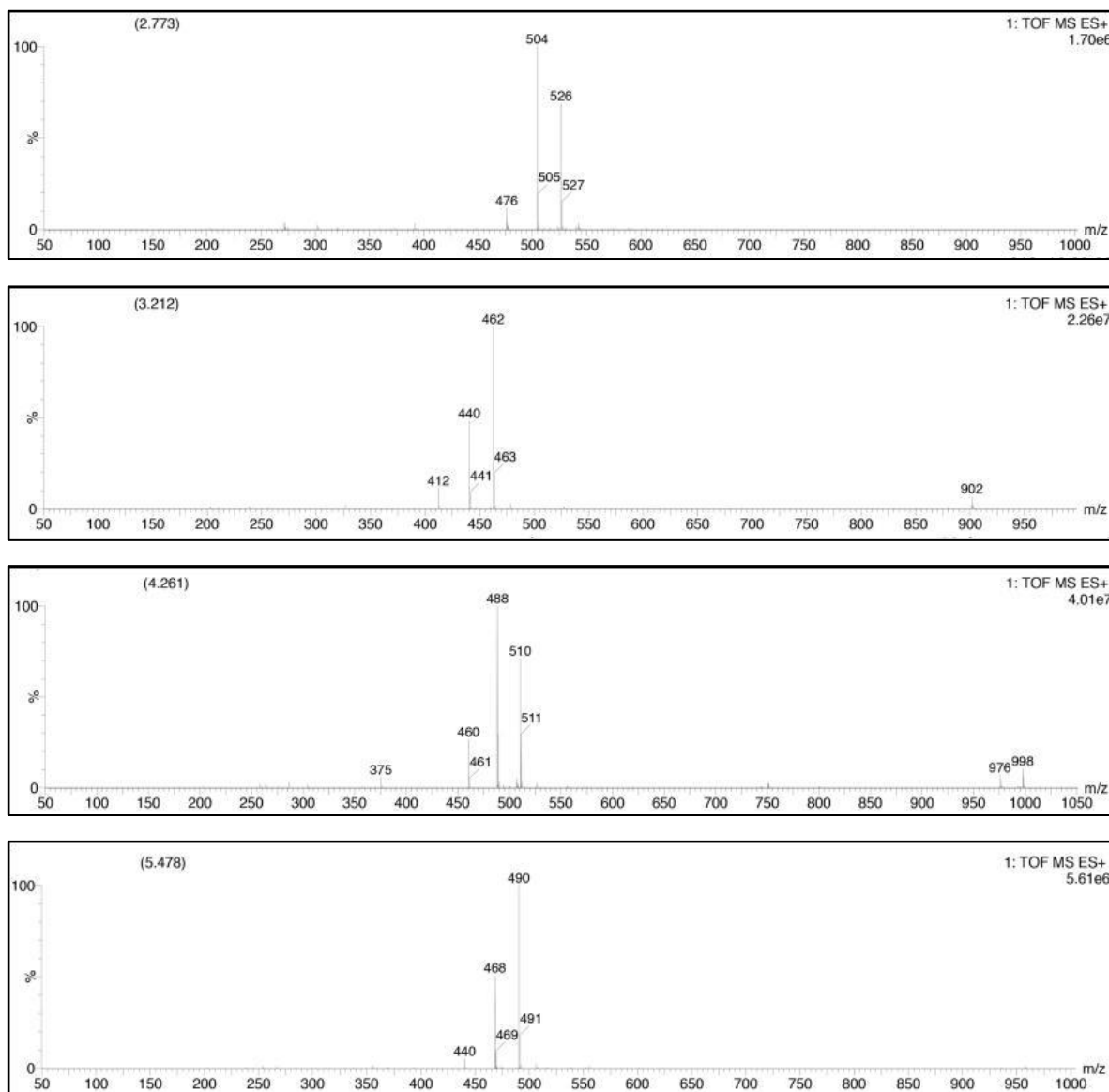


Figura 37a. Espectros de masas (ionización por electrospray) para los compuestos más abundantes de la fracción FPfII-s del extracto orgánico de *I. fumosorosea*.

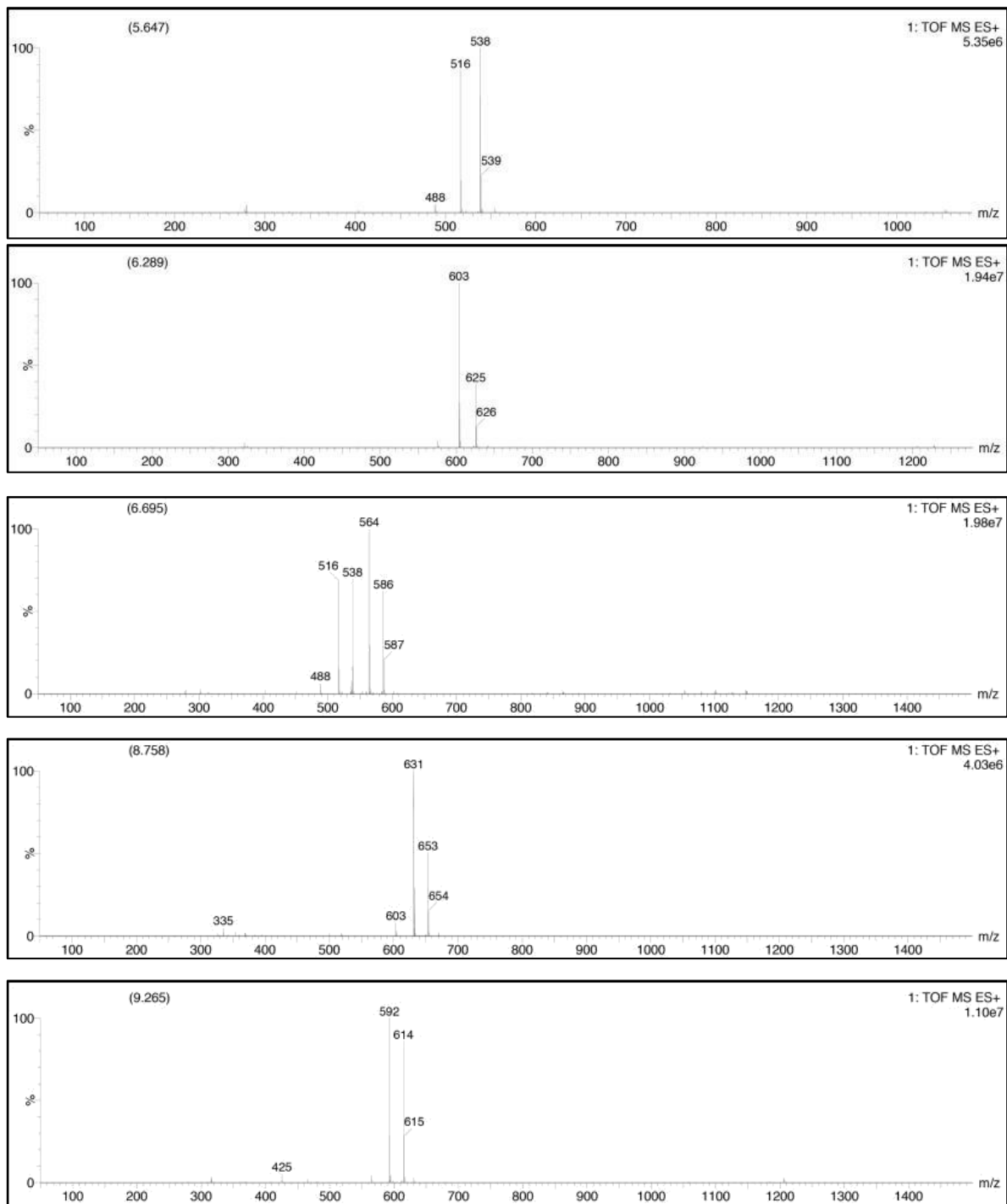


Figura 37b. Espectros de masas (ionización por electrospray) para los compuestos más abundantes de la fracción FPfII-s del extracto orgánico de *I. fumosorosea*.

Tabla 8. Estructura y composición de las beuverólidas identificadas en la fracción FPfII-s.

Tiempo de Retención (min) ^a	Beuverólida	n*	R*	AA1*	AA2*	AA3*	Peso/ Fórm.Cond.	m/z	
								[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
2.773	N (118)	3	Me	Tyr	Ala	Leu	503 C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₆	504	526
3.212	M (117)	3	Me	Val	Ala	Leu	439 C ₂₃ H ₄₁ N ₃ O ₅	440	462
4.261	I (115)	3	Me	Phe	Ala	Leu	487 C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₅	488	510
5.478	P (119)	5	Me	Val	Ala	Leu	467 C ₂₅ H ₄₅ N ₃ O ₅	468	490
5.647	L (112)	5	Me	Phe	Ala	Leu	515 C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₅	516	538
6.289	J _a (116)	3	Me	Trp	Phe	allo-Ile	602 C ₃₅ H ₄₆ N ₄ O ₅	603	625
6.695	F (114)	3	Me	Phe	Phe	Ile	563 C ₃₃ H ₄₅ N ₃ O ₅	564	586
8.758	K _a (123)	5	Me	Trp	Phe	allo-Ile	630 C ₃₇ H ₅₀ N ₄ O ₅	631	653
9.265	C (113)	5	Me	Phe	Phe	Ile	591 C ₃₅ H ₄₉ N ₃ O ₅	592	614

^aTiempo de retención observado en el cromatograma de la Figura 33 * Para ver el significado de n, R y los residuos AA1, AA2 y AA3, referirse a la Figura 38.

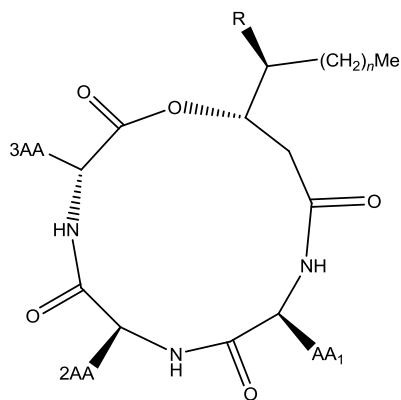


Figura 38. Núcleo general de las beuverólidas.

Posteriormente, la fracción FPfII-s (195 mg) fue analizada mediante CLAE, y se logró obtener el perfil cromatográfico que se muestra en la Figura 39. El escalamiento de las condiciones

CLAE en modo semi-preparativo permitió la obtención purificación de los compuestos puros correspondientes a los picos I-VII.

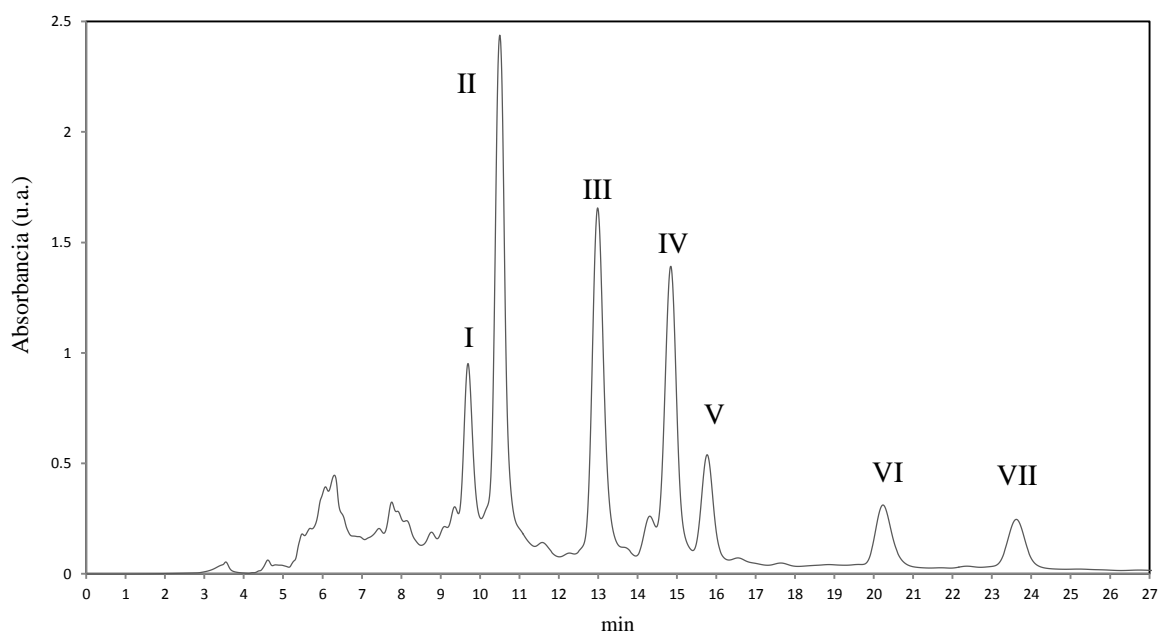


Figura 39. Cromatograma para la fracción fracción FPfII-s de *I. fumosorosea* 503-3. Columna: Symmetry C18 250x4.6mm. Fase Móvil: ACN-H₂O (90:10). Flujo: 0.5 mL/min. Longitud: 215 nm.

El análisis de los datos espectroscópicos (¹H y ¹³C-RMN, IR, **Figuras A3-A4**) y espectrométricos del producto correspondiente al pico III, permitió establecer la identidad de dicho compuesto como la beuverólida I, (**115**) corroborándose mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura. Debido a la poca cantidad recuperada de los productos restantes, la identidad de dichos compuestos se estableció mediante el análisis en conjunto de sus espectros de masas, de UV y de IR. Los metabolitos entonces, correspondían a la serie de las beuverólidas: C (**113**, $t_R = 23.6$ min, 3.3 mg), F (**114**, $t_R = 20.2$ min, 2.8 mg), I (**115**, $t_R = 13.0$ min, 13.4 mg), J_a (**116**, $t_R = 15.8$ min, 3.0 mg), L (**112**, $t_R = 14.8$ min, 4.7 mg), M (**117**, $t_R = 10.4$ min, 6.1 mg) y N (**118**, $t_R = 9.7$ min, 3.4 mg).

Los metabolitos fúngicos caracterizados se han descrito en varios microorganismos del género *Beauveria* y *Paecilomyces* (Kuzma, M., 2001; Jegorov, A., 2004). Las beuverólidas comparten un ciclo de 13 miembros con un residuo de ácido graso (3-hidroxi-) y tres residuos de

aminoácido. Diversas evaluaciones biológicas de estos metabolitos han permitido comprobar que las beuverólidas no son micotoxinas, ya que presentan actividad bactericida, fungicida, insecticida o efectos citotóxicos. Estudios recientes han indicado que las beuverólidas podrían servir como nuevas cabezas de serie para el desarrollo de fármacos en el tratamiento de la aterosclerosis. En este trabajo de investigación, se decidió explorar la probable actividad anti-CaM de estos productos de origen fúngico.

6.2.1 Evaluación de la actividad anti-CaM de las beuverólidas (112 - 119)

Se evaluó la actividad anti-CaM de las beuverólidas aisladas en el ensayo de fluorescencia previamente descrito, haciendo uso de un nuevo biosensor fluorescente de CaM, *hCaMM124C-AF₃₅₀*. Este dispositivo mostró una eficiencia cuántica alta ($\phi = 0.842$) en comparación con la proteína silvestre *hCaM* ($\phi = 0.025$). Además, este fluoróforo provee respuestas en el espectro de UV, haciendo posible el análisis de extractos orgánicos o compuestos puros coloridos que pudieran interferir con la respuesta del biosensor. Las gráficas de apagamiento de la fluorescencia se muestran en la **Figura 40**.

Las constantes de disociación calculadas (K_d) demuestran una afinidad significativa de estos productos fúngicos, sugiriendo una directa interacción con la proteína calmodulina. El compuesto más activo fue la beuverólida J_a , (**116**) con una K_d cerca de diez veces mayor que la CPZ, usada como control positivo. De acuerdo a estos resultados, la presencia de un grupo triptófano en la beuverólida J_a podría estar relacionado con su alta afinidad por la CaM. A su vez, esta buena afinidad observada por **116** podría estar relacionada con la alta hidrofobicidad del triptófano en comparación con otros residuos, como la fenilalanina, valina o tirosina, presentes en las otras beuverólidas evaluadas.

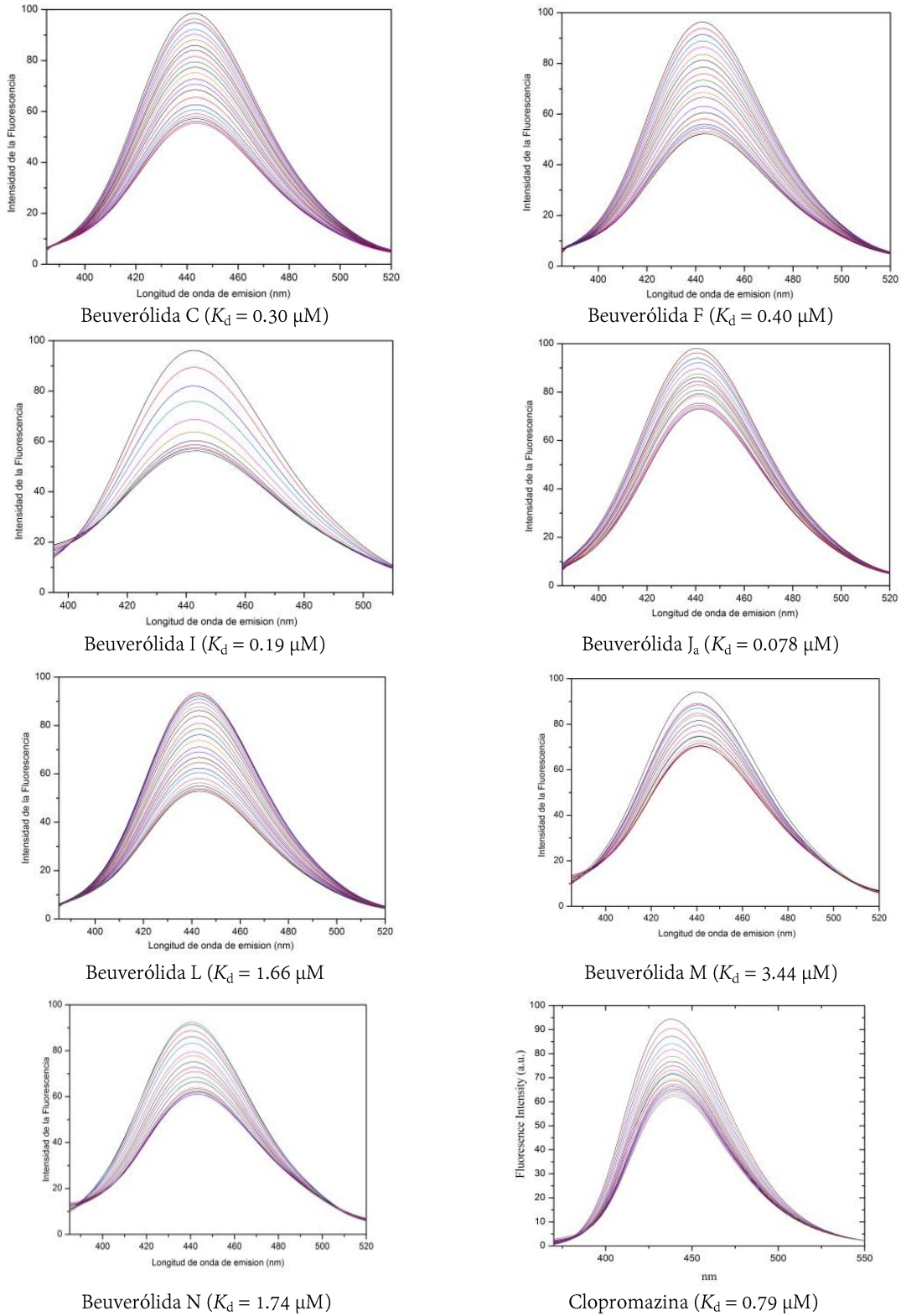


Figura 40. Espectros de fluorescencia de *hCaMM124C-AF₃₅₀* (5 μM) a saturación con el ion Ca^{2+} (10 mM), para las beauverólidas (112 – 118). Las muestras fueron excitadas a 257 nm, y los espectros de emisión fueron colectados de 375 nm a 550 nm.

El estudio de acoplamiento molecular entre las beuverólidas aisladas de *I. fumosorosea* y la proteína calmodulina, se llevó a cabo usando la estructura co-cristalizada de CaM con la TFP (código PDB 1A29) mediante el programa de modelado molecular AutoDock 4.2. Los resultados se esquematizan en la **Figura 41**, y en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos del estudio teórico de “docking” (ELUE; K_i) en comparación con el resultado experimental (K_d).

	<i>n</i>	Beuverólida			ELUE ^a (kcal)	K_i^b (mM)	K_d^c (mM)
		<i>aa1</i>	<i>aa2</i>	<i>aa3</i>			
J _a (116)	3	Trp	Phe	Ile	-8.74	0.39	0.08
I (115)	3	Phe	Ala	Leu	-6.84	9.70	0.19
C (113)	5	Phe	Phe	Ile	-8.00	1.37	0.30
F (114)	3	Phe	Phe	Ile	-8.45	0.63	0.40
L (112)	5	Phe	Ala	Ile	-8.14	1.08	1.66
N (118)	3	Tyr	Ala	Leu	-7.17	5.55	1.74
M (117)	3	Val	Ala	Leu	-6.85	9.54	3.44

^aELUE: Energía Libre de Unión Estimada; ^b K_i : Constante de inhibición teórica; ^c K_d : Constante de disociación experimental (afinidad).

Los resultados obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular con la CaM sugieren que, en todos los casos, las beuverólidas se unen en un sitio similar al de la CPZ o TFP, compuestos bien caracterizados como ligantes clásicos de la calmodulina. Este sitio comprende los residuos de aminoácido Glu14, Ala15, Leu18, Phe92, Ile100, Leu105, Leu109, Glu114, Met124, Ile125, Glu127, Ala128, Phe141, Met144. Todas las interacciones resultaron ser de tipo hidrofóbica, ya que en ningún caso se observó formación de enlaces de hidrógeno. Como se había mencionado anteriormente, la beuverólida que tuvo la mejor afinidad hacia la CaM en el experimento de fluorescencia, fue la beuverólida J_a; este resultado correlaciona bien con el obtenido en el estudio teórico de docking (denotado por su baja energía de unión, Tabla 9).

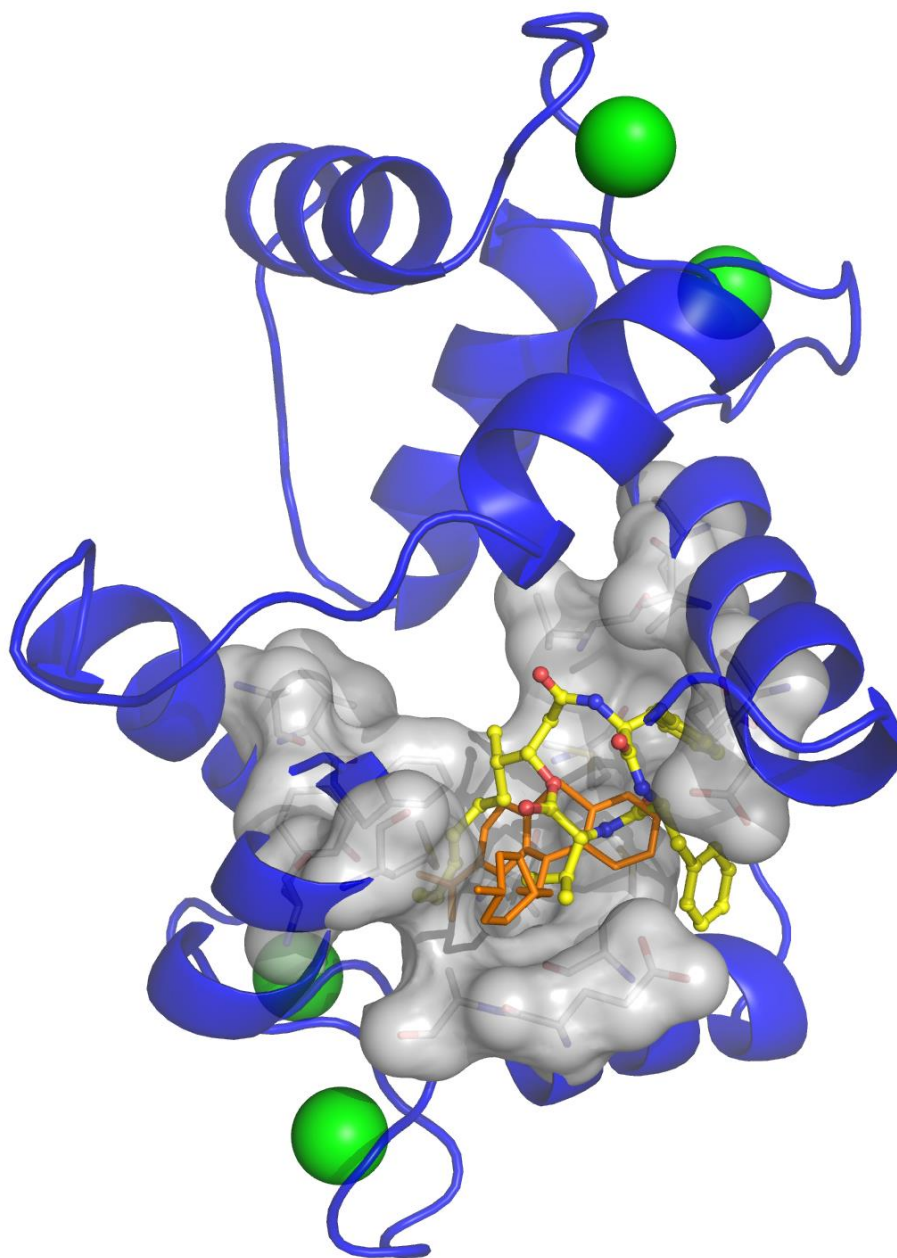


Figura 41a. Sitio de interacción común de los productos 112- 118 (superficie gris) con la CaM (listones azul; los iones calcio se representan como esferas verdes). Se muestra el resultado del docking de la beaverolida Ja (116) en bastones y esferas amarillas, así como el de la TFP (bastones naranjas). Figura reparada con Pymol.

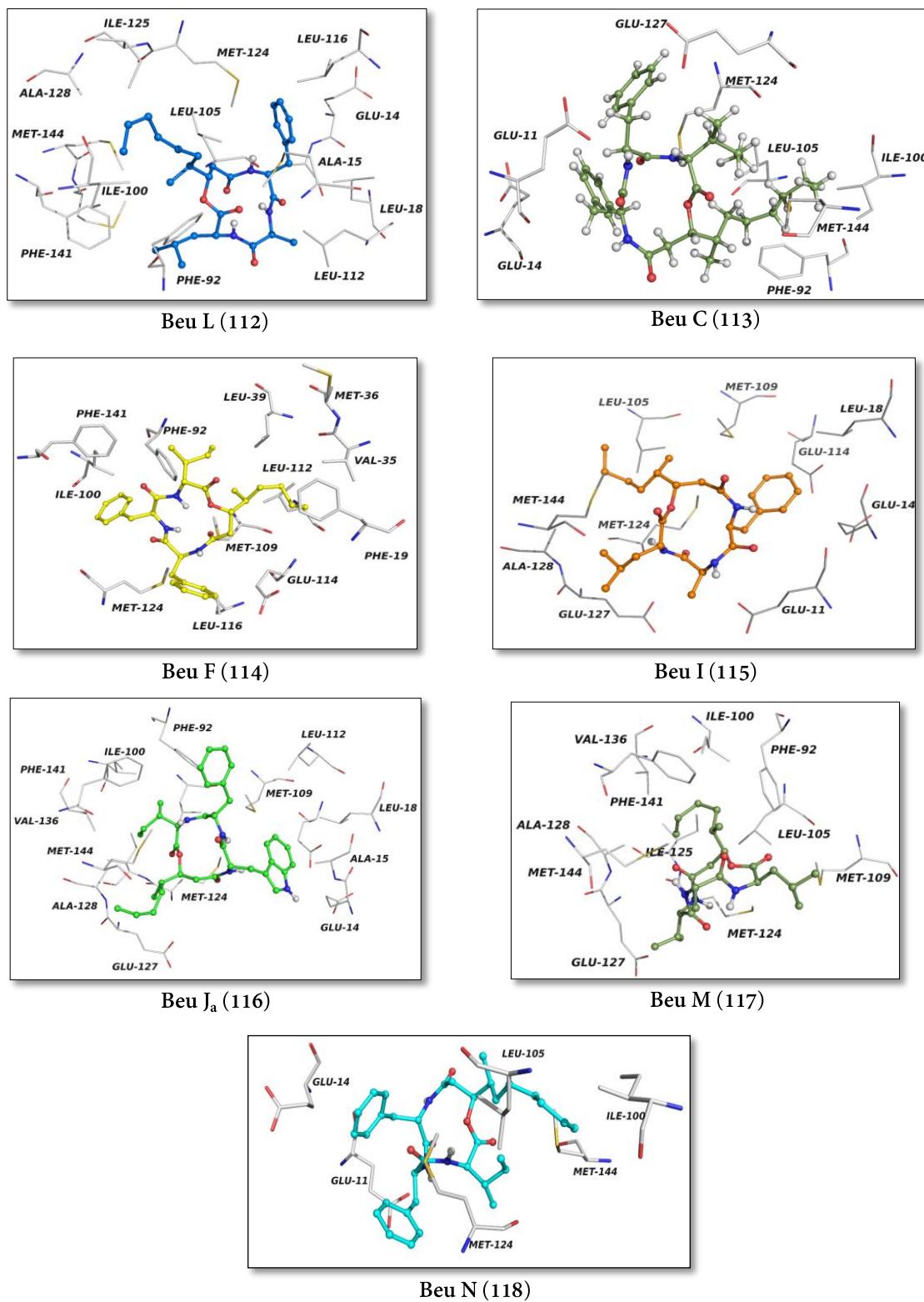


Figura 41b. Sitio de interacción de los productos 112- 118 (bastones y esferas) y los residuos de aminoácido involucrados (bastones blancos). Figura reparada con Pymol.

Consideraciones de estructura química- actividad permiten clasificar a las beuverólidas restantes en dos grupos: aquellas que en las posiciones *aa1* y *aa3* contienen residuos de Phe e Ile, respectivamente, y aquellas que presentan en las posiciones *aa2* y *aa3* residuos de Ala y Leu, respectivamente. El primer conjunto corresponde a las beuverólidas C, F y L, las cuales, después de la beuverólida J_a, tuvieron la mejor afinidad en el ensayo experimental y estudio teórico. Las beuverólidas N y M conforman el siguiente grupo, con una menor actividad. Cabe mencionar que el largo de la cadena (denotado por el indicador *n*) no tiene impacto alguno en la actividad anti-CaM.

En resumen, se aislaron siete ciclotetrapepsipéptidos de la especie fúngica *Isaria fumosorosea*, y se demostró su potencial actividad como ligantes de la proteína CaM. Este resultado representa el primer reporte de actividad anti-CaM para este tipo de metabolitos.

6.3 Actividad vasorrelajante de las malbranqueamidas (51-53)

Con la finalidad de establecer si la gran afinidad de las malbranqueamidas por la CaM correlaciona con una actividad relajante de la musculatura lisa como en el caso de la clorpromazina, se exploró el potencial vasorelajante de las malbranqueamidas 51-53. Para ello, se realizó en un experimento *ex vivo*, empleando aorta de rata como tejido de prueba según la metodología descrita por Saponara (Saponara *et al.*, 2006) y modificada por Estrada-Soto (Torres-Piedra *et al.*, 2011). Este ensayo permite detectar un efecto vasodilatador de compuestos empleando cortes anulares de aorta de rata previamente contraídos con noradrenalina (NA, 0.1 μ M). Los experimentos se efectúan en presencia y ausencia del endotelio con la finalidad de discriminar entre los distintos mecanismos de acción involucrados en el proceso de relajación muscular (**Figura 42** y Tabla 10).

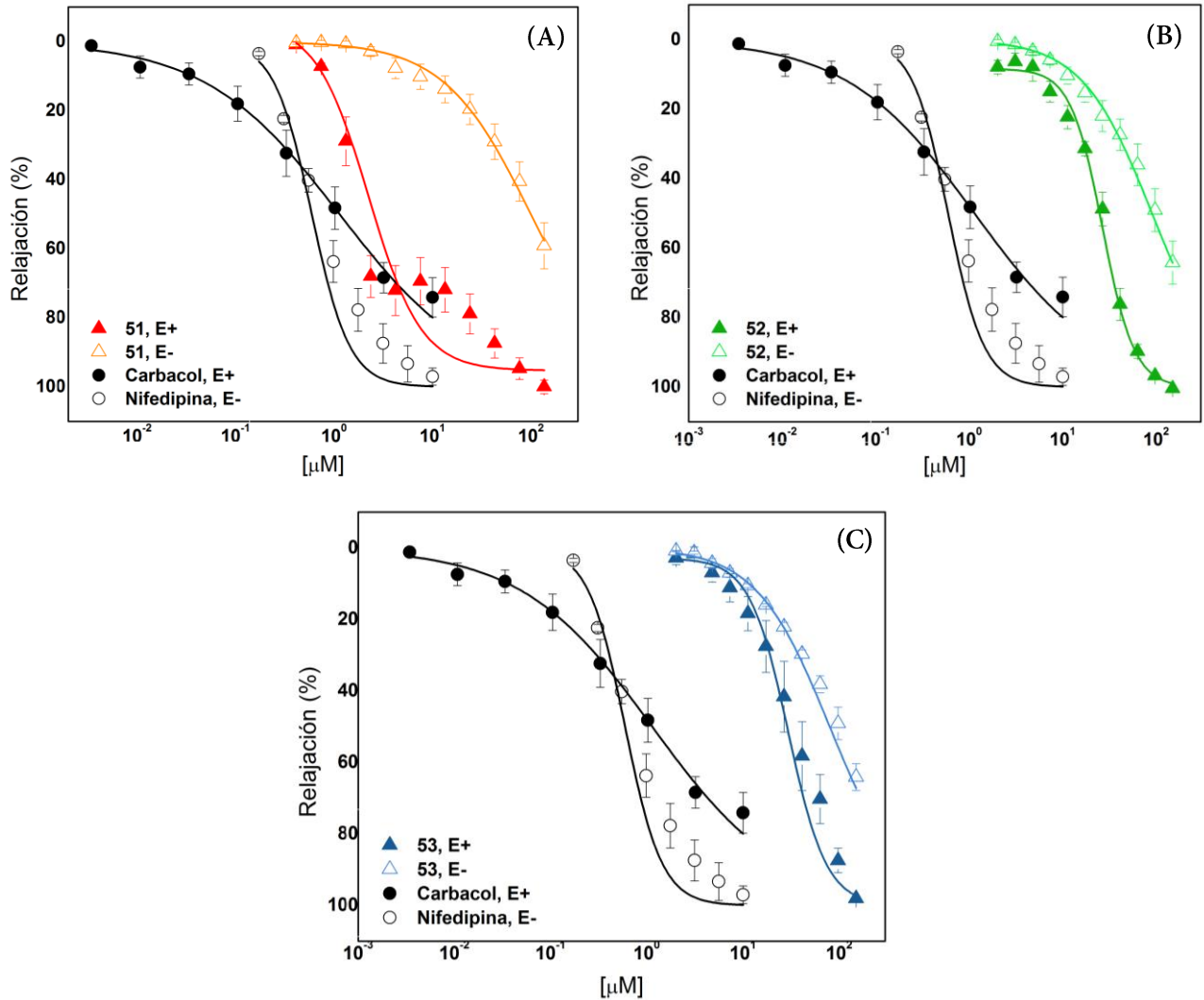


Figura 42. Efecto vasorrelajante de A) malbranqueamida (51), B) malbranqueamida B (52) y c) isomalbranqueamida B (53) en aorta de rata pre-contráida con noradrenalina, en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio.

Tabla 10. Valores de E_{max} y CE_{50} para los compuestos 51-53 evaluados en experimentos con y sin endotelio de aorta de rata.

Compuesto	Con endotelio (E +)		Sin endotelio (E -)	
	E_{max} (%)	CE_{50} (μ M)	E_{max} (%)	CE_{50} (μ M)
51	99.97 \pm 1.95	2.74	59.13 \pm 6.68	42.07
52	98.08 \pm 0.56	33.28	64.14 \pm 3.73	44.68
53	100.42 \pm 0.66	25.49	64.17 \pm 6.21	47.52
Carbacol	74.06 \pm 5.7	0.42	ND	ND
Nifedipina ²	ND	ND	97.00 \pm 2.48	0.65

¹Control positivo para experimentos E+. ²Control positivo para experimentos E-. ND: No determinado.

De acuerdo a los resultados los tres alcaloides inducen una actividad vasorrelajante significativa en forma dependiente del endotelio y de la concentración, observándose un efecto máximo de aproximadamente el 100%, oco usual en los productos naturales. En los experimentos sin endotelio, su efecto fue menor pero significativo, indicando que su acción relajante involucra mecanismos tanto dependientes como independientes de endotelio.

De manera general, los mecanismos dependientes de endotelio involucran la producción de óxido nítrico (NO) catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), o el incremento de prostaciclina PGI₂ por diversas causas (Chang *et al.*, 2010; Feletou *et al.*, 2011). Los procesos que no dependen de endotelio tienen lugar en las células de músculo liso, y son un tanto complejos. Éstos involucran una interferencia con los α -adrenoceptores, el bloqueo de canales de calcio, apertura de canales de potasio, un incremento en los niveles de los segundos mensajeros como el AMPc o el GMPc, o bien una inhibición de la actividad del complejo Ca²⁺-CaM (Walsh *et al.*, 2011; Wynne *et al.*, 2009).

Con el objetivo de discernir entre algunas de estas posibilidades, se exploró el efecto relajante de la malbranqueamida (51) en presencia de agonistas y antagonistas selectos. Así, para los mecanismos dependientes de endotelio, se utilizó un inhibidor no selectivo de la óxido nítrico sintasa, el L-NAME; un inhibidor de la ciclooxigenasa, la indometacina, y un agente anticolinérgico, la atropina. Para los mecanismos derivados de células de músculo liso, se empleó el tetraetilamonio (TEA), un bloqueador de canales de potasio no selectivo. Los resultados se muestran en la **Figura 44** y Tabla 11.

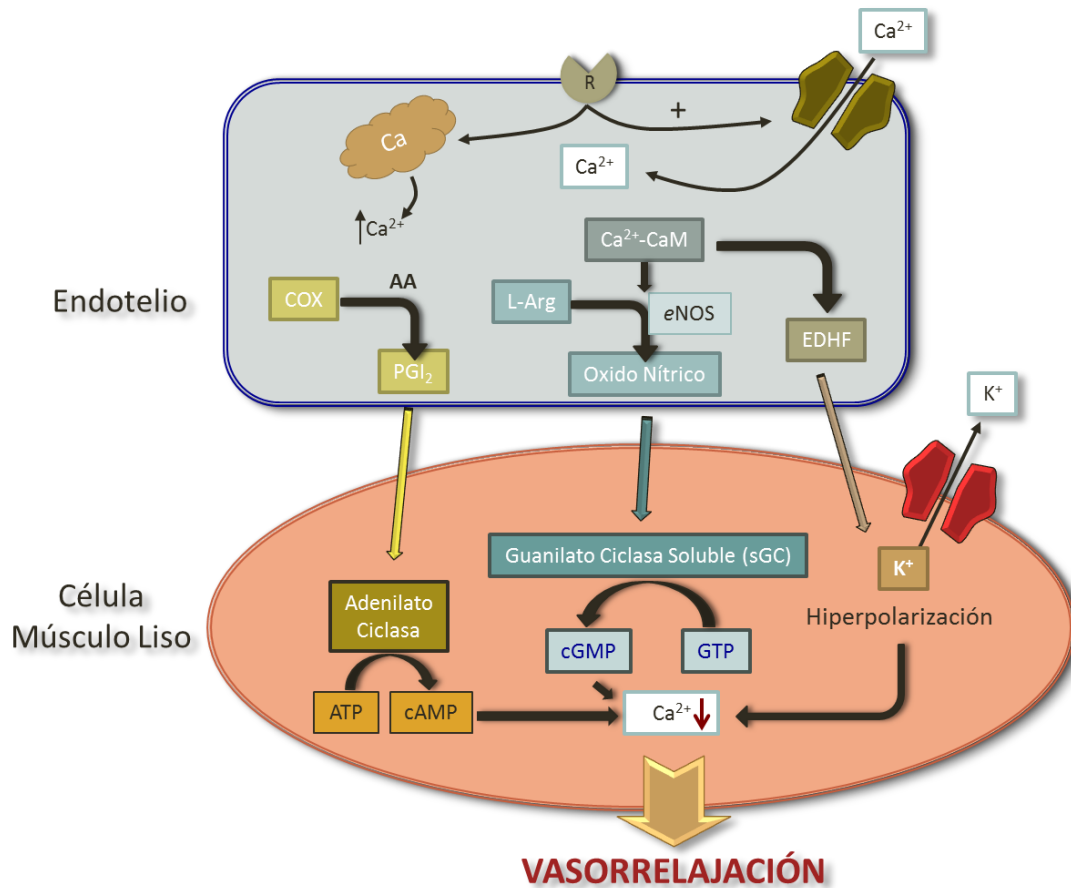


Figura 43. La prostaciclina (PGI₂) activa la adenilato ciclasa, promoviendo un aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP). El óxido nítrico (NO) activa la guanilato ciclasa (liberado a través de la reacción enzimática de la eNOS), produciendo un incremento en los niveles de GMP cíclico (cGMP). El factor de hiperpolarización derivado de endotelio (EDHF, por sus siglas en inglés), el cual se ha propuesto que sea K⁺, causa que los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ en células de músculo liso vascular se abran, conduciendo a su hiperpolarización. AA, ácido araquidónico; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; COX, ciclooxigenasa; SR, receptor de membrana.

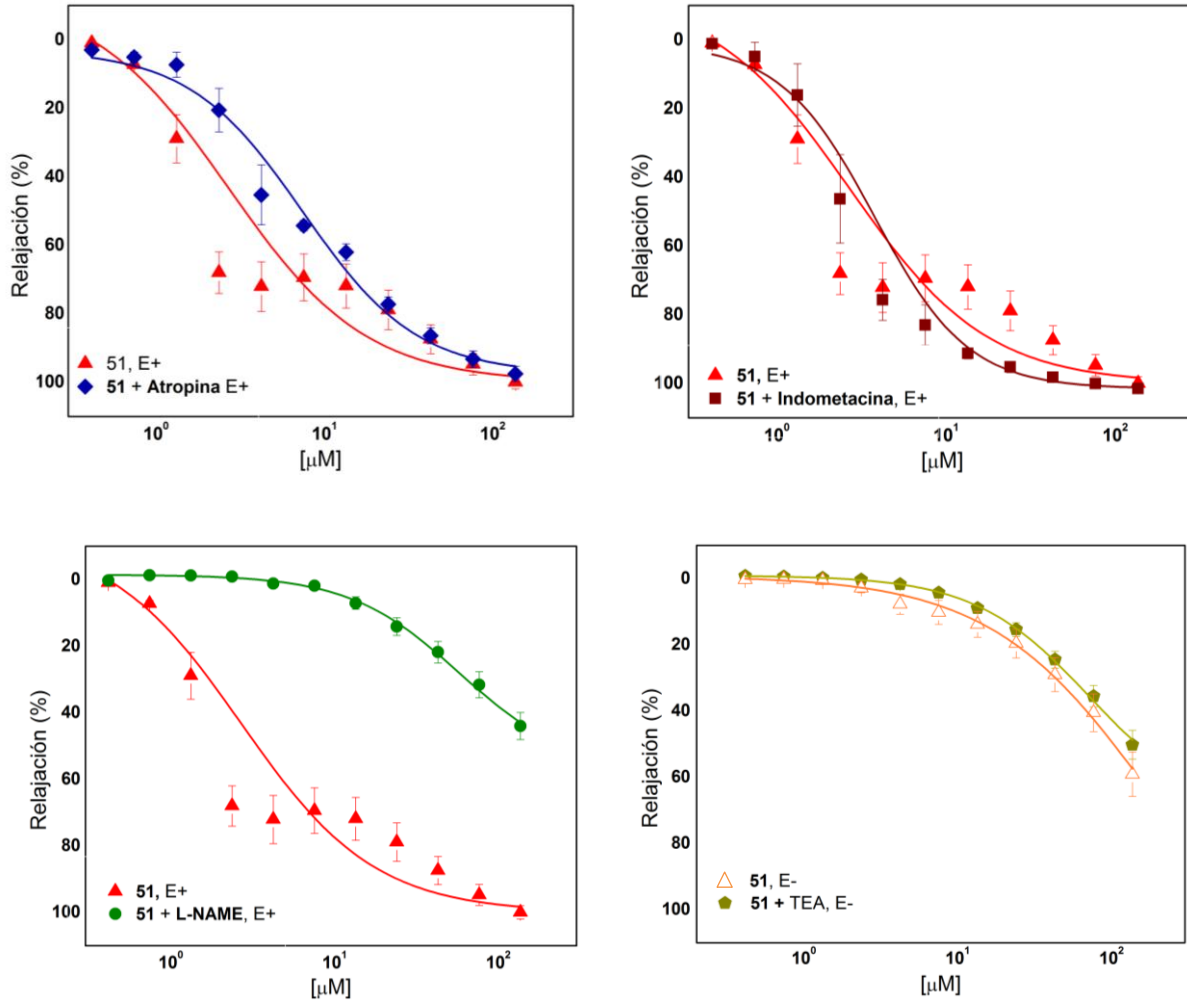


Figura 44. Curvas concentración-respuesta vasorrelajante para la malbrancheamida (51) en aorta de rata pre-tratada con (a) atropina, (b) indometacina, (c) L-NAME y (d) tetraetilamonio (TEA); pre-contráida con NA (0.1μM).

Tabla 11. Parámetros farmacológicos en la determinación del modo de acción de la malbrancheamida.

Compuesto	Con endotelio (E +)		Sin endotelio (E -)	
	E_{max} (%)	CE_{50} (μM)	E_{max} (%)	CE_{50} (μM)
L-NAME + 51	44.01 ± 4.04	41.76	ND	ND
Indometacina + 51	101.51 ± 1.41	2.75	ND	ND
TEA + 51	ND	ND	50.21 ± 4.36	43.03
Atropina + 51	97.55 ± 2.23	6.68	ND	ND

ND: No determinado.

El único experimento en el que la respuesta relajante de la malbranqueamida se afectó de manera significativa, fue en el realizado en presencia de L-NAME en tejido intacto. El efecto observado consistió en una reducción significativa de la vasorrelajación provocada por el alcaloide en ausencia del inhibidor. Este hallazgo sugiere una participación de factores de relajación presentes en el endotelio, tales como el óxido nítrico (NO).

Por otra parte, los resultados obtenidos en los otros experimentos permitieron descartar la participación de efectos mediados por prostaglandinas, canales de potasio o una acción colinérgica.

Aunque otros mecanismos de acción podrían estar involucrados en el efecto vasodilatador dependiente de endotelio, el hecho de que la malbranqueamida es un ligante bien caracterizado de la CaM, permite proponer que su modo de acción vasorelajante también está mediado por la CaM, posiblemente a través de un impedimento para activar la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK), necesaria para promover la contracción muscular. En músculo liso, la contracción se inicia por la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC), causando que se desprenda de los filamentos de actina. Esta fosforilación es catalizada por la MLCK dependiente del complejo Ca^{2+} -CaM (Filenko *et al.*, 1997). De esta manera, cualquier molécula capaz de evitar la formación del complejo Ca^{2+} -CaM-MLCK podrá interferir con la activación de la cinasa y la consiguiente contracción del músculo liso. En este contexto, en estudios recientes se demostró que la malbranqueamida (**51**) puede prevenir *in vitro* la formación del complejo activo Ca^{2+} -CaM-MLCK; así, el alcaloide desplazó a la MLCK de su complejo con Ca^{2+} -CaM con una constante de disociación de $K_d = 0.61 \mu\text{M}$ (González-Andrade *et al.*, 2013).

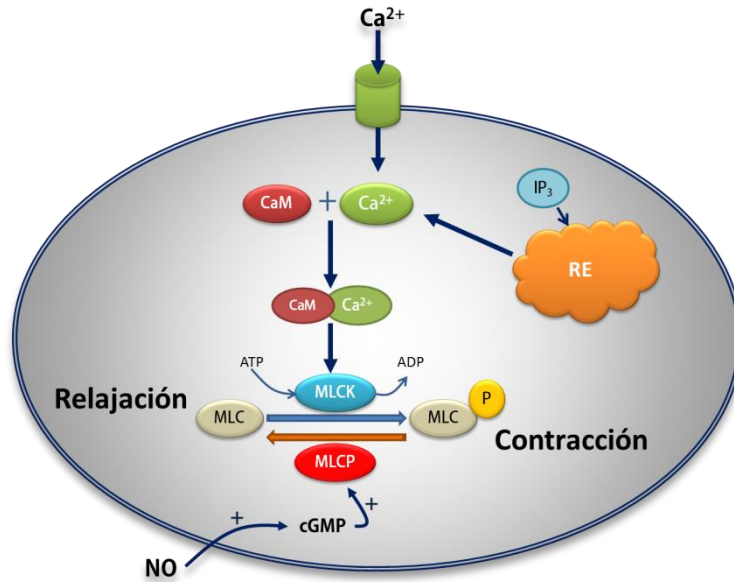


Figura 45. El aumento de calcio (Ca^{2+}) en células de músculo liso, ya sea por entrada a través de canales de Ca^{2+} mediados por voltaje, o por liberación del retículo endoplásmico (RE) mediada por inositoltrifosfato (IP_3), promueve la formación del complejo Ca^{2+} -CaM. Este complejo modula la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC) por parte de la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK), lo que conlleva a un proceso de contracción. La entrada de óxido nítrico (NO) a la célula aumenta la formación de cGMP que a su vez estimula a la fosfatasa de la MLC (MLCP) para revertir el proceso de fosforilación y una consecuente relajación.

La trascendencia que podría tener este hallazgo *in vivo* sería la inhibición de la fosforilación de la MLCK y, en consecuencia, un efecto vasorrelajante (**Figura 45**). En el contexto de los experimentos *ex vivo* este mecanismo se sumaría al nitrérgico para explicar el efecto vasorelajante del alcaloide.

Con la finalidad de profundizar en el efecto mediante nitrérgico del alcaloide se realizaron estudios *in silico* a través del acoplamiento molecular (docking) de las malbranqueamidas con la óxido nítrico sintasa endotelial. Las sintasas de óxido nítrico (NOS) son enzimas homodiméricas dependientes de Ca^{2+} , cada monómero contiene un dominio N-terminal oxigenasa y un dominio C-terminal reductasa, conectados por un dominio de unión a CaM (Persechini *et al.*, 2013; **Figura 45**).

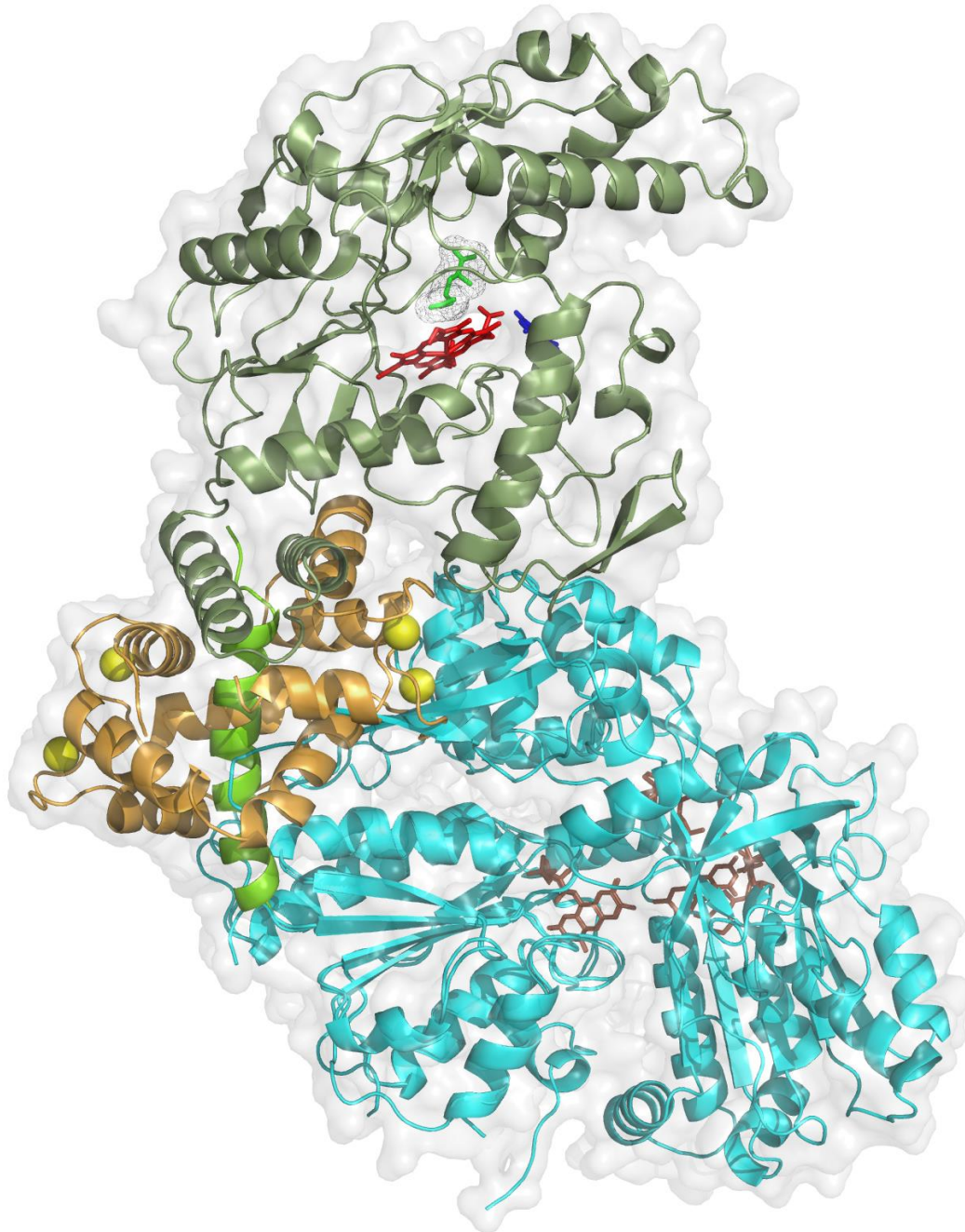


Figura 46. Modelo de la eNOS construido a partir de las estructuras cristalizadas del dominio oxigenasa (pdb 3NOS, listones verde oscuro), del dominio reductasa (pdb 1TLL, listones azul) y el complejo del péptido de unión a CaM con la CaM unida (pdb 3HR4, listones verde limón para el péptido de unión y listones café para la CaM). En el dominio oxigenasa se encuentra el grupo Hemo (Hem) representado por bastones rojos, el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) representada por bastones azules y la arginina (bastones magenta). En el dominio reductasa están los cofactores FAD, FMN y NADPH (bastones café). Figura preparada con Pymol.

Las sintasas de óxido nítrico se clasifican en tres grupos, *i*NOS (inducible), *n*NOS (neuronal) y *e*NOS (endotelial), según su distribución y localización subcelular (Hemmens y Mayer *et al.*, 1998). Las tres isoformas comparten la misma arquitectura: (i) el dominio catalítico N-terminal oxigenasa (NOSox) que tiene unido el grupo Fe-protoporfirina (hemo) y el cofactor (6*R*)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4), sitio al cual se une el sustrato L-arginina; (ii) el dominio C-terminal reductasa (NOSred) que contiene sitios de unión para el NADPH, el dinucleótido flavina adenina (FAD) y el mononucleótido de flavina (FMN); (iii) y, finalmente, la región intermedia entre ambos dominios (NOSox y NOSred), que es un péptido pequeño que interactúa con el complejo Ca²⁺-CaM (Aoyagi *et al.*, 2003). Cuando la concentración de Ca²⁺ intracelular alcanza un determinado nivel, la *e*NOS se activa mediante su unión al complejo Ca²⁺-CaM provocando cambios conformacionales en la enzima y conduciendo al incremento de la transferencia de electrones del NADPH al centro del dominio oxigenasa donde se encuentra el grupo hemo (Hem) (Villanueva *et al.*, 2010). El producto de esta secuencia de eventos es la formación de NO. En la **Figura 47** se esquematiza la reacción de formación de NO a partir de L-arginina y oxígeno, con la participación del NADPH.

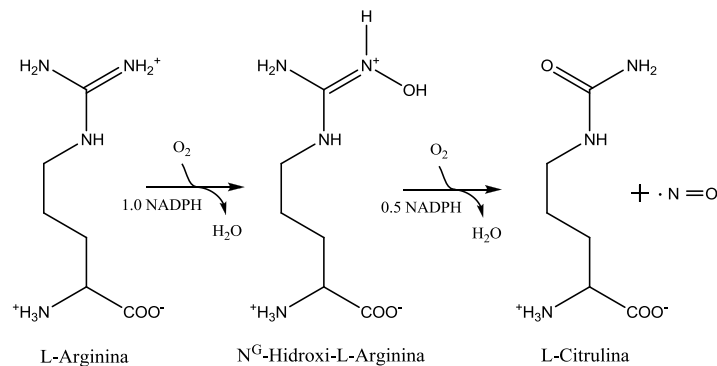


Figura 47. Formación de NO con catálisis de *e*NOS.

El óxido nítrico, también conocido como factor relajante derivado de endotelio (EDRF por sus siglas en inglés), activa la guanilato ciclasa soluble (sGC), que a su vez aumenta la producción de GMPc promoviendo el proceso de relajación. El NO es liberado continuamente en vasos

sanguíneos, elevando el tono vasodilatador y contribuyendo al control fisiológico de la presión arterial. Además de producir vasorrelajación, inhibe proliferación de células de músculo liso vascular, agregación plaquetaria, e inhibe la migración y adhesión de monocitos, por lo que se considera que puede proteger a los vasos sanguíneos de procesos ateroscleróticos y trombóticos (Kuriyama *et al.*, 1998).

El estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo con la estructura cristalizada de la eNOS, correspondiente al dominio oxigenasa (código PDB 3NOS, **Figura 48**). Como parte de un protocolo de validación del análisis de acoplamiento molecular, primero se sustrajo la L-arginina unida al sitio catalítico del dominio oxigenasa y se situó en un lugar aleatorio, posteriormente se llevó a cabo un docking ciego y la posición con mejor energía de unión se comparó con la posición original de la estructura cristalizada. El resultado de esta validación demostró un error medio cuadrático entre ambas posiciones despreciable. Una vez validado el estudio teórico, se llevó a cabo el análisis con los compuestos 51-53 (**Figura 49**, Tabla 12).



Figura 48. Modelo estructural del dominio oxigenasa de la eNOS (PDB 3NOS; listones verde oscuro) mostrando el sitio común de interacción (bastones en verde claro) de los compuestos 51-53.

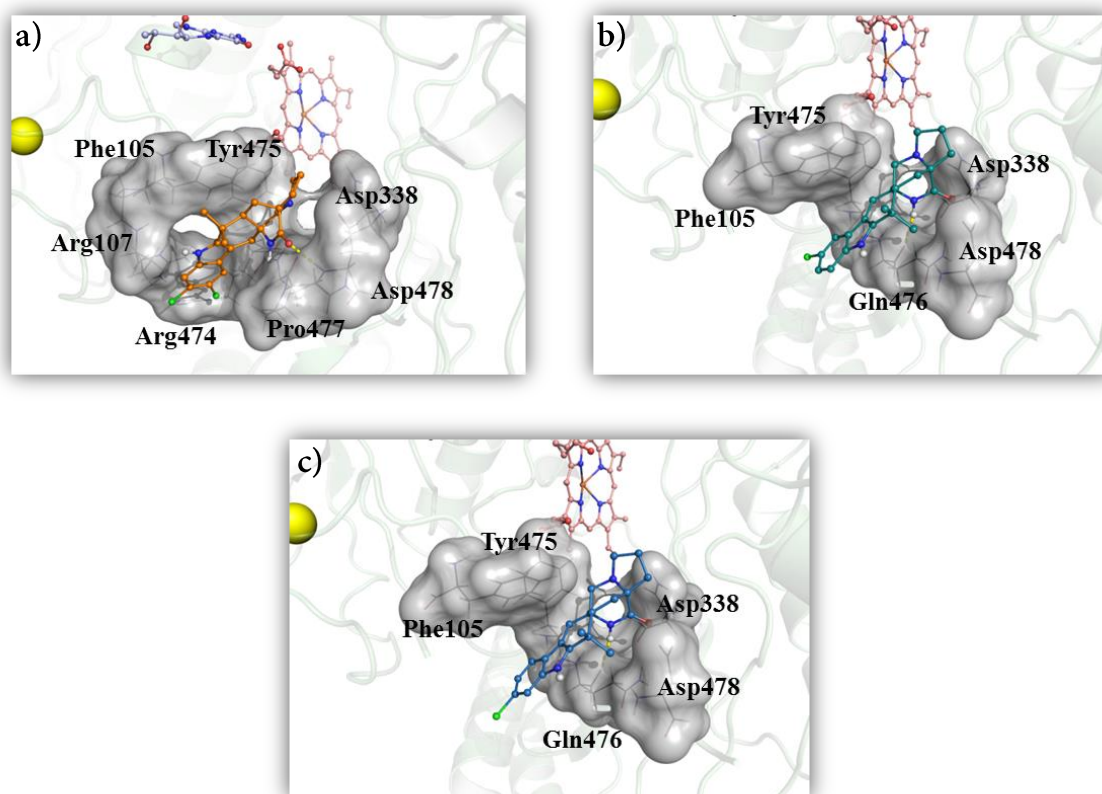


Figura 49. Detalles del sitio de interacción de (a) 51 en bastones naranja, (b) 52 en bastones verdes y (c) 53 en bastones azules con el dominio oxigenasa de la eNOS (PDB 3NOS).

Tabla 12. Resultados del docking para los compuestos 51-53.

Compuesto	eNOS (3NOS)	
	EFEB ¹ (kcal/mol)	Residuos de Interacción
51	-8.73	Phe105, Arg107, Arg474, Tyr475, Gln476, Pro477, Asp478
52	-8.19	Phe105, Asn338, Tyr475, Gln476, Asp478
53	-8.36	Phe105, Asn338, Tyr475, Gln476, Asp478

¹Energía Libre de Unión Estimada.

Como se muestra en la Tabla 12 y Figura 47, las malbranqueamidas podrían interactuar con la eNOS en un sitio de unión diferente al sitio catalítico. Esta zona de interacción comprende a los sitios C1 y C2, los cuales constituyen canales de acceso del sustrato al sitio catalítico, pero lejos del mismo (Ji *et al.*, 2003). Los metabolitos fúngicos 51-53 forman enlaces de hidrógeno con los residuos Asp478 (para 51), o con Gln476 (para 52 y 53). Estas interacciones pueden estabilizar a

los ligantes dentro del sitio C1, contribuyendo de esta manera con una energía de unión favorable (-8.73 kcal/mol). Estos resultados en conjunto, sugieren que las malbranqueamidas se unen a los sitios C1 y C2 de la eNOS en forma alostérica y promoviendo la activación de dicha enzima, y la producción de óxido nítrico, con la consecuente relajación del tejido muscular. Algunos reportes similares se han descrito previamente para la dihidrospinochalcona A y algunos triterpenoides (Ladurner *et al.*, 2012; Ríos *et al.*, 2012).

Para descartar de manera teórica que las malbranqueamidas no interfieren con la unión del complejo Ca^{2+} -CaM y la eNOS, se realizó el acoplamiento molecular de los alcaloides con el péptido de unión a CaM formando un complejo con Ca^{2+} -CaM (PDB 1NIW). Este fragmento es un péptido pequeño, anfifílico que contiene de 15 a 20 aminoácidos y funciona como conector de los dominios oxigenasa y reductasa de la eNOS (**Figura 50**).

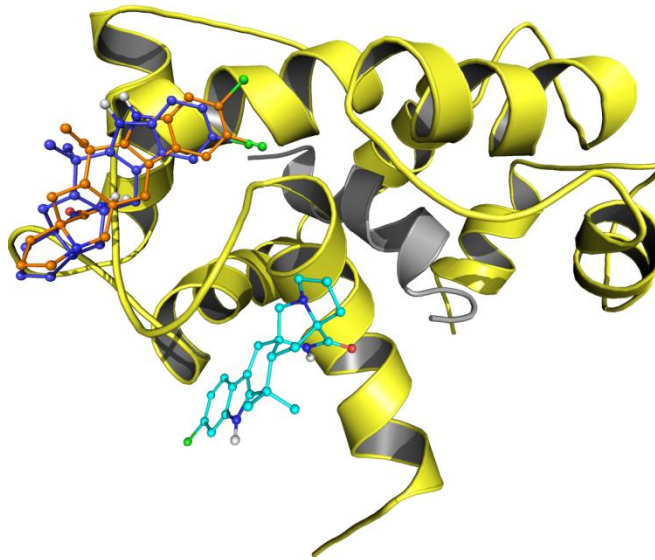


Figura 50. Modelo para el acoplamiento de la malbranqueamida (bastones esferas naranja), malbranqueamida b (bastones y esferas azules) y la isomalbranqueamida b (bastones y esferas azules) con el péptido de unión a CaM de la eNOS (carón gris) unido a la CaM (cartón amarillo) (PDB 1NIW).

Los resultados del estudio teórico mostraron que 51-53 presentan menor afinidad por el péptido, que por el dominio oxigenasa, resultado que se refleja en las energías de unión (-7.16 kcal/mol para

el dominio de unión a CaM, y -8.73 kcal/mol para el dominio oxigenasa. Este hallazgo, aunado a la diferencia de afinidades por la CaM entre la malbranqueamida ($K_d = 1.11 \mu\text{M}$) y el péptido de unión a CaM ($K_d = 0.040 \mu\text{M}$), permite proponer que el alcaloide no inhibe la formación del complejo Ca^{2+} -CaM-eNOS, permitiendo así el proceso nitrérgico de vasorrelajación, que en conjunto con la vía no nitrérgica observada experimentalmente, explican el efecto farmacológico de estos productos.

7 Conclusiones

- 7.1 El estudio químico la especie *Purpureocillium lilacinum* condujo al aislamiento de dos compuestos de tipo xantona-antraquinona, la acremonidina A (**121**) y cremoxantona C (**122**). La aplicación de métodos computacionales permitió determinar la configuración absoluta de los centros estereogénicos de **122**, desconocida a la fecha.
- 7.2 Los resultados representan el primer reporte de heterodímeros de xantona-antraquinona en el género *Purpureocillium*. Previamente se habían descrito en especies de los géneros *Cercospora*, *Humicola* y *Acremonium*. Este último pertenece a la misma familia de *P. lilacinum*.
- 7.3 Los metabolitos **121** y **122** interactúan con la proteína calmodulina con una alta afinidad, ya que sus constantes de disociación (K_d) se encuentran en el orden nanomolar (19.22 nM y 18.35 nM, respectivamente). Este grado de afinidad es poco usual, ya que con algunas excepciones, los productos de origen natural se unen a la proteína con constantes en el rango micromolar.
- 7.4 De acuerdo a los estudios teóricos de acoplamiento molecular, el sitio de interacción de **121** y **122** con la CaM es diferente al de los inhibidores clásicos. Un evidencia experimental que sustentó la propuesta fue el apagamiento de la fluorescencia del biosensor *hCaMT110C-mBBr*, concebido para la detección de inhibidores no clásicos. Resulta interesante destacar que el sitio de unión de estos productos citotóxicos coincide con el del KAR-2, un potente agente antimetabólico derivado de la vinblastina que carece de efectos adversos. Este hallazgo es de particular importancia, pues los ligandos que interaccionan con la CaM en un dominio novedoso no inhiben la mayoría de las propiedades moduladoras de esta proteína.
- 7.5 Las beuverólidas L (**112**), C (**113**), F (**114**), I (**115**), J_a (**116**), M (**117**) y N (**118**) aisladas de *Isaria fumosorosea* presentan actividad como ligantes de la CaM. La beuverólida J_a (**116**) presentó la mejor afinidad. Dado que **116** es el único compuesto en la serie que contiene un

residuo de triptófano, la presencia de éste último podría estar relacionado con su mejor afinidad por la proteína. El estudio teórico de acoplamiento molecular sugiere que el sitio más probable de unión a CaM de las beuverólidas comprende el sitio de interacción clásico. Estos resultados representan el primer reporte de actividad anti-CaM para éste tipo de compuestos, los que constituyen entonces nuevas herramientas de investigación para el análisis de los procesos mediados por CaM.

- 7.6 De manera adicional, se evaluó la actividad vasorrelajante de las malbranqueamidas (**51-53**), alcaloides aislados de la especie *Malbranchea aurantiaca*, mediante un experimento *ex vivo* en anillos de aorta de rata, siendo el producto más activo la malbranqueamida (**51**). Los estudios de mecanismo de acción conducidos con **51** indicaron que su efecto involucra tanto la vía nitrgica como otras no nitrégicas, incluyendo la inhibición de la fosforilación de la MLCK activada por el complejo Ca^{2+} -CaM. En consecuencia, las malbranqueamidas representan candidatos apropiados para el desarrollo de nuevos agentes antihipertensivos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Y., Saito, S., Hori, M., Ozaki, H., Fusetani, N., Karaki, H. 1997. Stelletamide-A, a novel inhibitor of calmodulin, isolated from a marine sponge. *British Journal of Pharmacology*, **121**(7), 1309-14.
- Acharya, K.R., Lloyd, M.D. 2005. The advantages and limitations of protein crystal structures. *Trends Pharmacology Science*, **26**(1), 10-4.
- Albady, M.A., Elokely, K.M., Wang, B., Bowling, J.J., Abdelwahab, M.F., Hossein, M.H., Doerksen, R.J., Hamann, M.T. 2013. Computationally assisted assignment of kahalalide y configuration using an NMR-constrained conformational search. *Journal of Natural Products*, **76**(2), 178-185.
- Allen, M.W., Urbauer, R.J., Zaidi, A., Williams, T.D., Urbauer, J.L., Johnson, C.K. 2004. Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments. *Analytical Biochemistry*, **325**(2), 273-84.
- Aoyagi, M., Arvai, A.S., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. 2003. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *Embo Journal*, **22**(4), 766-75.
- Asaff, A., Cerda-García-Rojas, C.M., Viniegra-González, G., de la Torre, M. 2006. Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochemistry*, **41**(6), 1303-1310.
- Au, T.K., Chick, W.S.H., Leung, P.C. 2000. The biology of ophiobolins. *Life Sciences*, **67**(7), 733-742.
- Autschbach, J. 2014. Relativistic calculations of magnetic resonance parameters: background and some recent developments. *Philosophical Transactions A Mathematical, physical and engineering sciences*, **372**(2011), 20120489.
- Ayers, S., Graf, T.N., Adcock, A.F., Kroll, D.J., Shen, Q., Swanson, S.M., Matthew, S., Carcache de Blanco, E.J., Wani, M.C., Darveaux, B.A., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. 2012. Cytotoxic xanthone-anthraquinone heterodimers from an unidentified fungus of the order Hypocreales (MSX 17022). *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **65**(1), 3-8.
- Babu, Y.S., Bugg, C.E., Cook, W.J. 1988. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *Journal Molecular Biology*, **204**(1), 191-204.
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., Cook, W.J. 1985. Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature*, **315**(6014), 37-40.
- Bar Sagi, D., Prives, J. 1983. Trifluoperazine, a calmodulin antagonist, inhibits muscle cell fusion. *Journal of Cell Biology*, **97**(51), 1375-1380.
- Berchtold, M.W., Villalobo, A. 2014. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochemistry and Biophysics Acta*, **1843**(2), 398-435.
- Bernardini, M., Carilli, A., Pacioni, G., Santurbano, B. 1975. Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, **14**(8), 1865.
- Bhatia, S., Bhakri, G., Arora, M., Uppal, S.K., Batta, S.K. 2010. Dextranase production from *Paecilomyces lilacinus* and its application for dextran removal from sugarcane juice. *Sugar Technology*, **12**(2), 133-138.
- Bicker, W., Kacprzak, K., Kwit, M., Lämmerhofer, M., Gawronski, J., Lindner, W. 2009. Assignment of absolute configurations of permethrin and its synthon 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid by electronic circular dichroism, optical rotation, and X-ray crystallography. *Tetrahedron Asymmetry*, **20**(9), 1027-1035.

- Bickler, P.E., Zhan, X., Fahlman, C.S. 2005. Isoflurane preconditions hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation: role of intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase signaling. *Anesthesiology*, **103**(3), 532-9.
- Bifulco, G., Dambruoso, P., Gomez-Paloma, L., Riccio, R. 2007. Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. *Chemical Reviews*, **107**(9), 3744-3779.
- Black, D.J., Tran, Q.K., Persechini, A. 2004. Monitoring the total available calmodulin concentration in intact cells over the physiological range in free Ca²⁺. *Cell Calcium*, **35**(5), 415-25.
- Blake, R.A., Broome, M.A., Liu, X., Wu, J., Gishizky, M., Sun, L., Courtneidge, S.A. 2000. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Molecular Cell Biology*, **20**(23), 9018-27.
- Bostrom, S.L., Westerlund, C., Rochester, S., Vogel, H.J. 1988. Binding of a dihydropyridine felodipine-analogue to calmodulin and related calcium-binding proteins. *Biochemistry Pharmacology*, **37**(19), 3723-8.
- Boswell-Smith, V., Spina, D., Page, C.P. 2006. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, **147**(SUPPL. 1), S252-S257.
- Cerda-García-Rojas, C. & Pereda-Miranda, R. 1999. Programa FRACMOL para el cálculo de fracciones molares. Departamento de Química, CINVESTAV-IPN, Facultad de Química, UNAM, México.
- Chang, G.J., Lin, T.P., Ko, Y.S., Lin, M.S. 2010. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation induced by CIJ-3-2F, a novel benzyl-furoquinoline with antiarrhythmic action, in rat aorta. *Life Science*, **86**(23-24), 869-79.
- Charpentreau, M., Jaworski, K., Ramirez, B.C., Tretyn, A., Ranjeva, R., Ranty, B. 2004. A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein. *Biochemistry J*, **379**(Pt 3), 841-8.
- Cheng, Y., Schneider, B., Riese, U., Schubert, B., Li, Z., Hamburger, M. 2004. Farinosones A-C, neurotrophic alkaloidal metabolites from the entomogenous deuteromycete *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Natural Products*, **67**(11), 1854-1858.
- Cheung, W.Y. 1980. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*, **207**(4426), 19-27.
- Chin, D., Means, A.R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, **10**(8), 322-8.
- Chock, S.P., Huang, C.Y. 1984. An optimized continuous assay for cAMP phosphodiesterase and calmodulin. *Analytical Biochemistry*, **138**(1), 34-43.
- Chou, J.J., Li, S., Bax, A. 2000. Study of conformational rearrangement and refinement of structural homology models by the use of heteronuclear dipolar couplings. *Journal Biomol NMR*, **18**(3), 217-27.
- Cimino, M., Weiss, B. 1988. Characteristics of the binding of phenoxybenzamine to calmodulin. *Biochemical Pharmacology*, **37**(14), 2739-2745.
- Cimino, P., Gomez-Paloma, L., Duca, D., Riccio, R., Bifulco, G. 2004. Comparison of different theory models and basis sets in the calculation of ¹³C NMR chemical shifts of natural products. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **42**(SPL.ISS.1), S26-S33.
- Claydon, N., Grove, J.F. 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **40**(3), 413-418.

- Cohen, M.E., Sharp, G.W., Donowitz, M. 1986. Suggestion of a role for calmodulin and phosphorylation in regulation of rabbit ileal electrolyte transport: effects of promethazine. *American Journal of Physiology*, **251**(5 Pt 1), G710-7.
- Cordon, T.C., Schwartz, J.H. 1962. The fungus beauveria tenella. *Science*, **138**(3546), 1265-1266.
- Cui, X., Li, C.W., Wu, C.J., Hua, W., Cui, C.B., Zhu, T.J., Gu, Q.Q. 2013. Secondary metabolites of *Paecilomyces lilacinus* ZBY-1 and their antitumor activity. *Journal of International Pharmaceutical Research*, **40**(6), 765-771+794.
- Dai, M., Krauss, I.J., Danishefsky, S.J. 2008. Total synthesis of spirotenuipesines A and B. *Journal of Organic Chemistry*, **73**(24), 9576-9583.
- Daly, J.W., Harper, J. 2000. Loperamide: novel effects on capacitative calcium influx. *Cell Molecular Life Science*, **57**(1), 149-57.
- del Rio, B., Garcia Pedrero, J.M., Martinez-Campa, C., Zuazua, P., Lazo, P.S., Ramos, S. 2004. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *Journal of Biology Chemistry*, **279**(37), 38294-302.
- Demirci, F., Denizhan, E. 2010. *Paecilomyces lilacinus*, a potential biocontrol agent on apple rust mite *Aculus schlechtendali* and interactions with some fungicides in vitro. *Phytoparasitica*, **38**(2), 125-132.
- Dong, Q., Wang, H., Xing, X., Ji, S. 2012. Identification and characterization of a special species of *Paecilomyces*. *Annals of Microbiology*, **62**(4), 1587-1592.
- Ducrot, P.H. 2001. *Cercospora beticola* toxins. NMR studies and chemical behaviour. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIC: Chemistry*, **4**(4), 273-283.
- Edlind, T., Smith, L., Henry, K., Katiyar, S., Nickels, J. 2002. Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. *Molecular Microbiology*, **46**(1), 257-68.
- Elbandy, M., Shinde, P.B., Hong, J., Bae, K.S., Kim, M.A., Lee, S.M., Jung, J.H. 2009. α -pyrones and yellow pigments from the sponge-derived fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **30**(1), 188-192.
- Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M., Charudattan, R. 2006. Herbicidal potential of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(5), 1779-83.
- Feletou, M., Huang, Y., Vanhoutte, P.M. 2011. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology*, **164**(3), 894-912.
- Figueroa, M., Gonzalez Mdel, C., Rodriguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., Gonzalez-Andrade, M., Cerda-Garcia-Rojas, C.M., Mata, R. 2009. Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **17**(6), 2167-74.
- Figueroa, M., Gonzalez-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazon, A., Del Rio-Portilla, F., Gonzalez Mdel, C., Mata, R. 2011. Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **26**(3), 378-85.
- Filenko, A.M., Danilova, V.M., Sobieszek, A. 1997. Smooth muscle myosin light chain kinase, supramolecular organization, modulation of activity, and related conformational changes. *Biophysical Journal*, **73**(3), 1593-1606.
- Gabdoulline, R.R., Wade, R.C. 2002. Biomolecular diffusional association. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**(2), 204-13.

- Gangopadhyay, J.P., Grabarek, Z., Ikemoto, N. 2004. Fluorescence probe study of Ca²⁺-dependent interactions of calmodulin with calmodulin-binding peptides of the ryanodine receptor. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, **323**(3), 760-8.
- Gesell, M., Hammer, E., Mikolasch, A., Schauer, F. 2004. Oxidation and ring cleavage of dibenzofuran by the filamentous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Archives of Microbiology*, **182**(1), 51-59.
- Gonzalez-Andrade, M., Figueroa, M., Rodriguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A. 2009. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **387**(1), 64-70.
- González-Andrade, M., Mata, R., Madariaga-Mazón, A., Rodríguez-Sotres, R., Del Pozo-Yauner, L., Sosa-Peinado, A. 2013. Importance of the interaction protein-protein of the CaM-PDE1A and CaM-MLCK complexes in the development of new anti-CaM drugs. *Journal of Molecular Recognition*, **26**(4), 165-174.
- González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Sosa-Peinado, A., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R. 2011. Development of the fluorescent biosensor hcalmodulin (hCaM)L39C-monobromobimane(mBBr)/V91C-mBBr, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**(11), 3875-3884.
- Guo, Z., She, Z., Shao, C., Wen, L., Liu, F., Zheng, Z., Lin, Y. 2007. (1)H and (13)C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). *Magnetic Resonance Chemistry*, **45**(9), 777-80.
- Hamill, R.L., Higgins, C.E., Boaz, H.E., Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to artemia salina. *Tetrahedron Letters*, **10**(49), 4255-4258.
- Haritakun, R., Srikikulchai, P., Khoyaiklang, P., Isaka, M. 2007. Isariotins A-D, alkaloids from the insect pathogenic fungus *Isaria tenuipes* BCC 7831. *Journal of Natural Products*, **70**(9), 1478-1480.
- Harmon, A.C., Jarrett, H.W., Cormier, M.J. 1984. An enzymatic assay for calmodulins based on plant NAD kinase activity. *Analytical Biochemistry*, **141**(1), 168-78.
- Hashida, J., Niitsuma, M., Iwatsuki, M., Mori, M., Ishiyama, A., Namatame, M., Nishihara-Tsukashima, A., Nonaka, K., Ui, H., Masuma, R., Ootoguro, K., Yamada, H., Shiomi, K., Omura, S. 2010. Pyrenocine I, a new pyrenocine analog produced by *Paecilomyces* sp. FKI-3573. *Journal of Antibiotics*, **63**(9), 559-561.
- He, H., Bigelis, R., Solum, E.H., Greenstein, M., Carter, G.T. 2003. Acremonidins, new polyketide-derived antibiotics produced by *Acremonium* sp., LL-Cyan 416. *Journal of Antibiotics*, **56**(11), 923-930.
- Hegemann, L., van Rooijen, L.A., Traber, J., Schmidt, B.H. 1991. Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin. *European Journal of Pharmacology*, **207**(1), 17-22.
- Hemmens, B., Mayer, B. 1998. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Molecular Biology*, **100**, 1-32.
- Hernandez-Abreu, O., Castillo-Espana, P., Leon-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., Gonzalez-Christen, J., Vergara-Galicia, J., Estrada-Soto, S. 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemistry Pharmacology*, **78**(1), 54-61.
- Hernandez-Romero, Y., Acevedo, L., Sanchez Mde, L., Shier, W.T., Abbas, H.K., Mata, R. 2005. Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(16), 6276-80.

- Hernandez-Romero, Y., Rojas, J.I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R. 2004. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products*, **67**(2), 160-7.
- Horvath, I., Harmat, V., Perczel, A., Palfi, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Naray-Szabo, G., Ovadi, J. 2005. The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *Journal of Biology Chemistry*, **280**(9), 8266-74.
- Hu, F.L., He, Y.Q., Huang, B., Li, C.R., Fan, M.Z., Li, Z.Z. 2009. Secondary metabolites in a soybean fermentation broth of *Paecilomyces militaris*. *Food Chemistry*, **116**(1), 198-201.
- Hu, Z.Y., Chen, S.L., Hao, Z.G., Huang, W.L., Peng, S.X. 1989. Benzylisoquinoline compounds inhibit the ability of calmodulin to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Cell Signal*, **1**(2), 181-5.
- Imming, P., Sinning, C., Meyer, A. 2006. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**(10), 821-34.
- Isaka, M., Palasarn, S., Auncharoen, P., Komwijit, S., Gareth Jones, E.B. 2009. Acremoxanthones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806. *Tetrahedron Letters*, **50**(3), 284-287.
- Jegorov, A., Paizs, B., Kuzma, M., Zabka, M., Landa, Z., Sulc, M., Barrow, M.P., Havlicek, V. 2004. Extraribosomal cyclic tetradepsipeptides beauverolides: profiling and modeling the fragmentation pathways. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**(8), 949-60.
- Jegorov, A., Sedmera, P., Mařha, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Landa, Z., Eyal, J. 1994. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, **37**(5), 1301-1303.
- Ji, H., Li, H., Flinspach, M., Poulos, T.L., Silverman, R.B. 2003. Computer modeling of selective regions in the active site of nitric oxide synthases: implication for the design of isoform-selective inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**(26), 5700-11.
- Jurado, L.A., Chockalingam, P.S., Jarrett, H.W. 1999. Apocalmodulin. *Physiological Reviews*, **79**(3), 661-682.
- Karplus, M. 1959. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *The Journal of Chemical Physics*, **30**(1), 11-15.
- Khan, A., Williams, K., Nevalainen, H. 2003. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. *FEMS Microbiology Letters*, **227**(1), 107-111.
- Kiewnick, S., Sikora, R.A. 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, **38**(2), 179-187.
- Kikuchi, H., Miyagawa, Y., Sahashi, Y., Inatomi, S., Haganuma, A., Nakahata, N., Oshima, Y. 2004a. Novel spirocyclic trichothecanes, spirotenuipepine A and B, isolated from entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. *Journal of Organic Chemistry*, **69**(2), 352-6.
- Kikuchi, H., Miyagawa, Y., Sahashi, Y., Inatomi, S., Haganuma, A., Nakahata, N., Oshima, Y. 2004b. Novel trichothecanes, paecilomycine A, B, and C, isolated from entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. *Tetrahedron Letters*, **45**(33), 6225-6228.
- Kobayashi, J., Sato, M., Murayama, T., Ishibashi, M., Walchi, M.R., Kanai, M., Shoji, J., Ohizumi, Y. 1991. Konbamide, a novel peptide with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine sponge *theonella* sp. *Journal of the Chemical Society – Series of Chemical Communications* (15), 1050-1052.

- Kondru, R.K., Chen, C.H.T., Curran, D.P., Beratan, D.N., Wipf, P. 1999. Determination of the absolute configuration of 1,3,5,7-tetramethyl-1,3-dihydroindol-2-one by optical rotation computation. *Tetrahedron Asymmetry*, **10**(21), 4143-4150.
- Kong, L.Y., Wang, P. 2013. Determination of the absolute configuration of natural products. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **11**(3), 193-8.
- Kovalevskaya, N.V., Van De Waterbeemd, M., Bokhovchuk, F.M., Bate, N., Bindels, R.J.M., Hoenderop, J.G.J., Vuister, G.W. 2013. Structural analysis of calmodulin binding to ion channels demonstrates the role of its plasticity in regulation. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, **465**(11), 1507-1519.
- Kuriyama, H., Kitamura, K., Itoh, T., Inoue, R. 1998. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiological Reviews*, **78**(3), 811-920.
- Kuzma, M., Jegorov, A., Kacer, P., Havlicek, V. 2001. Sequencing of new beauverolides by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrom*, **36**(10), 1108-15.
- Ladbury, J.E., Williams, M.A. 2004. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, **14**(5), 562-9.
- Ladurner, A., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Baumgartner, L., Schwaiger, S., Rollinger, J.M., Stuppner, H., Dirsch, V.M. 2012. 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(E)-propenylbenzofuran promotes endothelial nitric oxide synthase activity in human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, **84**(6), 804-812.
- Lakowicz, J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York, EUA: p. 86.
- Lalor, D.J., Schnyder, T., Saridakis, V., Pilloff, D.E., Dong, A., Tang, H., Leyh, T.S., Pai, E.F. 2003. Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity. *Protein Eng*, **16**(12), 1071-9.
- Lamers, J.M., Cysouw, K.J., Verdouw, P.D. 1985. Slow calcium channel blockers and calmodulin. Effect of felodipine, nifedipine, prenylamine and bepridil on cardiac sarcolemmal calcium pumping ATPase. *Biochemistry Pharmacology*, **34**(21), 3837-43.
- Lang, G., Blunt, J.W., Cummings, N.J., Cole, A.L.J., Munro, M.H.G. 2005. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Natural Products*, **68**(5), 810-811.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. 1984. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *Journal of Biology Chemistry*, **259**(5), 2742-7.
- Levine, S.N., Hollier, B. 1983. Aprindine inhibits calmodulin-stimulated phosphodiesterase and Ca-ATPase activities. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, **5**(1), 151-6.
- Leyte-Lugo, M., González-Andrade, M., González, M.D.C., Glenn, A.E., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. 2012. (+)-Ascosalitoxin and vermelhotin, a calmodulin inhibitor, from an endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*, **75**(9), 1571-1577.
- Li, Y.Q., Park, H.J., Han, E.S., Park, D.K. 2011. Inhibitory effect on B16/F10 mouse melanoma cell and HT-29 human colon cancer cell proliferation and cordycepin content of the butanol extract of *Paecilomyces militaris*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(7), 1066-1071.
- Lu, H.E., Jian, C.H., Chen, S.F., Chen, T.M., Lee, S.T., Chang, C.S., Weng, C.F. 2010. Hypoglycaemic effects of fermented mycelium of *Paecilomyces farinosus* (G30801) on high-fat fed rats with streptozotocin-induced diabetes. *Indian Journal Medicinal Research*, **131**, 696-701.

- Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S.B., Borman, A.M., Hywel-Jones, N.L., Samson, R.A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, **321**(2), 141-9.
- Luangsa-ard, J.J., Berkaew, P., Ridkaew, R., Hywel-Jones, N.L., Isaka, M. 2009. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. *Mycological Research*, **113**(12), 1389-1395.
- Luangsa-Ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., Manoch, L., Samson, R.A. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research*, **109**(5), 581-589.
- Macias, M., Gamboa, A., Ulloa, M., Toscano, R.A., Mata, R. 2001. Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry*, **58**(5), 751-8.
- Madariaga-Mazón, A. 2010. Malbrancheamidas: obtención a partir del crudo alcaloideo del extracto fúngico del hongo *Malbranchea aurantiaca* y evidencias adicionales de su interacción con la calmodulina utilizando métodos enzimáticos y espectroscópicos. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., González, M.D.C., Glenn, A.E., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. 2013. Absolute configuration of acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Natural Products*, **76**(8), 1454-1460.
- Marshak, D.R., Lukas, T.J., Watterson, D.M. 1985. Drug-protein interactions: Binding of chlorpromazine to calmodulin, calmodulin fragments, and related calcium binding proteins. *Biochemistry*, **24**(1), 144-150.
- Martínez-Luis, S., González, M.C., Ulloa, M., Mata, R. 2005. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry*, **66**(9), 1012-1016.
- Martínez-Luis, S., Pérez-Vasquez, A., Mata, R. 2007. Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry*, **68**(14), 1882-903.
- Masino, L., Martin, S.R., Bayley, P.M. 2000. Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin. *Protein Science*, **9**(8), 1519-29.
- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macias, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O., Timmermann, B.N. 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **64**(1), 285-91.
- Mata, R., Gamboa, A., Macias, M., Santillan, S., Ulloa, M., Gonzalez Mdel, C. 2003. Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(16), 4559-62.
- Matsuda, Y., Kase, H. 1987. KS-619-1, a new inhibitor of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces californicus*. *Journal of Antibiotics*, **40**(8), 1104-1110.
- Matsuda, Y., Nakanishi, S., Nagasawa, K., Kase, H. 1990. Inhibition by new anthraquinone compounds, K-259-2 and KS-619-1, of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry Pharmacology*, **39**(5), 841-9.
- Menyhárd, D.K., Keserucombining double acute accent, G.M., Náráy-Szabó, G. 2009. Calmodulin in complex with proteins and small molecule ligands: Operating with the element of surprise; implications for structure-based drug design. *Current Computer-Aided Drug Design*, **5**(4), 264-279.
- Michelin, M., Ruller, R., Ward, R.J., Moraes, L.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli Mde, L. 2008. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**(1), 17-25.

- Mier, T., Olivares-Redonda, G., Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., Lorenzana, M., Pérez-Torres, A., Toriello, C. 2005. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **88**(2), 103-111.
- Mikami, Y., Yazawa, K., Fukushima, K., Arai, T., Udagawa, S., Samson, R.A. 1989. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. *Mycopathologia*, **108**(3), 195-199.
- Milat, M.L., Blein, J.P., Einhorn, J., Tabet, J.C., Ducrot, P.H., Lallemand, J.Y. 1993. The yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Part II: Isolation and structure of beticolins 3 and 4. *Tetrahedron Letters*, **34**(9), 1483-1486.
- Molnar, A., Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B.G., Ovadi, J. 1995. Anti-calmodulin potency of indol alkaloids in in vitro systems. *European Journal of Pharmacology*, **291**(2), 73-82.
- Mongin, A.A., Cai, Z., Kimelberg, H.K. 1999. Volume-dependent taurine release from cultured astrocytes requires permissive $[Ca^{2+}]_i$ and calmodulin. *American Journal of Physiology*, **277**(4 Pt 1), C823-32.
- Muto, Y., Kudo, S., Nozawa, Y. 1983. Effects of local anesthetics on calmodulin-dependent guanylate cyclase in the plasma membrane of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry Pharmacology*, **32**(23), 3559-63.
- Nagai, K., Doi, T., Ohshiro, T., Sunazuka, T., Tomoda, H., Takahashi, T., Omura, S. 2008. Synthesis and biological evaluation of a focused library of beauveriolides. *Bioorg Medicinal Chemistry Letters*, **18**(15), 4397-400.
- Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Sato, S., Furukawa, Y., Furuya, K., Honma Kadotani, T.J., Kozasa, M., Haneishi, T. 1991. Cornexistin: A new fungal metabolite with herbicidal activity. *Journal of Antibiotics*, **44**(10), 1065-1072.
- Nakanishi, S., Ando, K., Kawamoto, I., Kase, H. 1989. KS-501 and KS-502, new inhibitors of Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase from *Sporothrix* sp. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **42**(7), 1049-55.
- Nakanishi, S., Matsuda, Y., Iwahashi, K., Kase, H. 1986. K-252b, c and d, potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **39**(8), 1066-71.
- Nam, K.S., Jo, Y.S., Kim, Y.H., Hyun, J.W., Kim, H.W. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, **69**(2), 229-237.
- Namatame, I., Tomoda, H., Si, S., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Omura, S. 1999. Beauveriolides, specific inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Beauveria* sp. FO-6979. *Journal Antibiotics (Tokyo)*, **52**(1), 1-6.
- Natchin Yu, V., Shakhmatova, E.I., Bakos, P. 1987. Water and sodium transport: effects of calcium channel blocker and calmodulin antagonists on the apical and basolateral membranes of amphibian epithelia. *General Physiology and Biophysics*, **6**(1), 35-44.
- Nilanonta, C., Isaka, M., Kittakop, P., Palittapongarnpim, P., Kamchonwongpaisan, S., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. 2000. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Medica*, **66**(8), 756-758.
- Oclarit, E., Cumagun, C. 2009. Evaluation of efficacy of *paecilomyces lilacinus* as biological control agent of *meloidogyne incognita* attacking tomato. *Journal of Plant Protection Research*, **49**(4), 337-340.

- O'Day, D.H. 2003. CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins. *Cell Signal*, **15**(4), 347-54.
- Okubo, T., Okada, S. 1998. Kinetic Analyses of Colloidal Crystallization in Alcoholic Organic Solvents and Their Aqueous Mixtures As Studied by Reflection Spectroscopy. *Journal of Colloidal Interface Science*, **204**(1), 198-204.
- Orosz, F., Horvath, I., Ovadi, J. 2006. New anti-mitotic drugs with distinct anti-calmodulin activity. *Mini Review of Medicinal Chemistry*, **6**(10), 1145-57.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L. 2006. How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**(12), 993-6.
- Pala, I., Srinivasan, A., Vig, P.J.S., Desai, D. 1999. Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by penicillium mycotoxins. *International Journal of Toxicology*, **18**(2), 91-96.
- Persechini, A., Tran, Q.K., Black, D.J., Gogol, E.P. 2013. Calmodulin-induced structural changes in endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*, **587**(3), 297-301.
- Reddy, A.S., Ben-Hur, A., Day, I.S. 2011. Experimental and computational approaches for the study of calmodulin interactions. *Phytochemistry*, **72**(10), 1007-19.
- Reyes-Ramírez, A., Leyte-Lugo, M., Figueroa, M., Serrano-Alba, T., González-Andrade, M., Mata, R. 2011. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of gigantol analogs as calmodulin inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**(7), 2699-2708.
- Rios, M.Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J.L., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vazquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S. 2012. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *Ex vivo* and *in silico* studies. *Fitoterapia*, **83**(6), 1023-1029.
- Rotta, R., Cunha Neto, A., de Lima, D.P., Beatriz, A., da Silva, G.V.J. 2010. Configuration of stilbene derivatives by ¹H NMR and theoretical calculation of chemical shifts. *Journal of Molecular Structure*, **975**(1-3), 59-62.
- Sánchez-Peña, S.R., Lara, J.S.J., Medina, R.F. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. *Journal of Insect Science*, **11**.
- Saponara, S., Testai, L., Iozzi, D., Martinotti, E., Martelli, A., Chericoni, S., Sgaragli, G., Fusi, F., Calderone, V. 2006. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca(2+)-activated K+ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, **149**(8), 1013-21.
- Schmidt, K., Gunther, W., Stoyanova, S., Schubert, B., Li, Z., Hamburger, M. 2002. Militarinone A, a neurotrophic pyridone alkaloid from *Paecilomyces militaris*. *Organic Letters*, **4**(2), 197-199.
- Shapiro, G.I., Tibes, R., Gordon, M.S., Wong, B.Y., Eder, J.P., Borad, M.J., Mendelson, D.S., Vogelzang, N.J., Bastos, B.R., Weiss, G.J., Fernandez, C., Sutherland, W., Sato, H., Pierceall, W.E., Weaver, D., Slough, S., Wasserman, E., Kufe, D.W., Von Hoff, D., Kawabe, T., Sharma, S. 2011. Phase I studies of CBP501, a G2 checkpoint abrogator, as monotherapy and in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, **17**(10), 3431-42.
- Sharma, R.K., Wang, J.H. 1979. Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, **10**, 187-98.

- Stoll, R., Ruppin, H., Domschke, W. 1988. Calmodulin-mediated effects of loperamide on chloride transport by brush border membrane vesicles from human ileum. *Gastroenterology*, **95**(1), 69-76.
- Strobl, J.S., Kirkwood, K.L., Lantz, T.K., Lewine, M.A., Peterson, V.A., Worley Iii, J.F. 1990. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. *Cancer Research*, **50**(17), 5399-5405.
- Sunagawa, M., Kosugi, T., Nakamura, M., Sperelakis, N. 2000. Pharmacological actions of calmidazolium, a calmodulin antagonist, in cardiovascular system. *Cardiovascular Drug Reviews*, **18**(3), 211-221.
- Tabata, N., Tomoda, H., Iwai, Y., Omura, S. 1996. Xanthoquinodin B3, a new anticoccidial agent produced by *Humicola* sp. FO-888. *Journal of Antibiotics*, **49**(3), 267-271.
- Tabata, N., Tomoda, H., Matsuzaki, K., Omura, S. 1993. Structure and biosynthesis of xanthoquinodins, anticoccidial antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, **115**(19), 8558-8564.
- Teles, A.P., Takahashi, J.A. 2013. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology Research*, **168**(4), 204-10.
- Thayer, S.A., Fairhurst, A.S. 1983. The interaction of dihydropyridine calcium channel blockers with calmodulin and calmodulin inhibitors. *Molecular Pharmacology*, **24**(1), 6-9.
- Timmons, C., Wipf, P. 2008. Density functional theory calculation of ¹³C NMR shifts of diazaphenanthrene alkaloids: Reinvestigation of the structure of samoquasine A. *Journal of Organic Chemistry*, **73**(22), 9168-9170.
- Tomoda, H., Doi, T. 2008. Discovery and combinatorial synthesis of fungal metabolites beauveriolides, novel antiatherosclerotic agents. *Accounts of Chemistry Research*, **41**(1), 32-9.
- Torres-Piedra, M., Figueroa, M., Hernández-Abreu, O., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S. 2011. Vasorelaxant effect of flavonoids through calmodulin inhibition: *Ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* approaches. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **19**(1), 542-546.
- Tsukamoto, S., Yamashita, T., Matsunaga, S., Fusetani, N. 1999. Stelletazole A: An antibacterial guanidinoimidazole alkaloid from a marine sponge *Stelletta* sp. *Tetrahedron Letters*, **40**(4), 737-738.
- Tsuruo, T. 1984. [Reversal of acquired resistance to vinca alkaloids and anthracycline antibiotics by calcium channel blockers and calmodulin inhibitors]. *Gan To Kagaku Ryoho*, **11**(3 Pt 2), 750-9.
- Ui, H., Shiomi, K., Suzuki, H., Hatano, H., Morimoto, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Sakamoto, K., Kita, K., Miyoshi, H., Tomoda, H., Tanaka, H., Omura, S. 2006. Paecilaminol, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. *Journal of Antibiotics*, **59**(9), 591-596.
- Van Schooneveld, T., Freifeld, A., Lesiak, B., Kalil, A., Sutton, D.A., Iwen, P.C. 2008. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis*, **10**(2), 117-22.
- Vandonselaar, M., Hickie, R.A., Quail, J.W., Delbaere, L.T.J. 1994. Trifluoperazine-induced conformational change in Ca²⁺-calmodulin. *Nature Structural Biology*, **1**(11), 795-801.
- VanScyoc, W.S., Shea, M.A. 2001. Phenylalanine fluorescence studies of calcium binding to N-domain fragments of *Paramecium* calmodulin mutants show increased calcium affinity correlates with increased disorder. *Protein Science*, **10**(9), 1758-68.

- Vertessy, B.G., Harmat, V., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., Orosz, F., Ovadi, J. 1998. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry*, **37**(44), 15300-10.
- Villanueva, C., Giulivi, C. 2010. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**(3), 307-316.
- Villarroel, A., Tagliatalata, M., Bernardo-Seisdedos, G., Alaimo, A., Agirre, J., Alberdi, A., Gomis-Perez, C., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., Malo, C., Areso, P. 2014. The ever changing moods of calmodulin: how structural plasticity entails transductional adaptability. *Journal of Molecular Biology*, **426**(15), 2717-35.
- Walsh, M.P. 2011. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications. *IUBMB Life*, **63**(11), 987-1000.
- Wang, J., Huang, Y., Fang, M., Zhang, Y., Zheng, Z., Zhao, Y., Su, W. 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology Medicinal Microbiology*, **34**(1), 51-7.
- Wang, Q., Xu, L. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules*, **17**(3), 2367-2377.
- Wen, L., Chen, G., She, Z., Yan, C., Cai, J., Mu, L. 2010. Two new paeciloxocins from a mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. *Russian Chemical Bulletin*, **59**(8), 1656-1659.
- Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J., Galaini-Wraight, S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, **17**(3), 203-217.
- Wynne, B.M., Chiao, C.W., Webb, R.C. 2009. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *Journal American Society of Hypertension*, **3**(2), 84-95.
- Yongxian Cheng, B.S., Ulrike Riese, Barbara Schubert, Zengzhi Li, Matthias Hamburger. 2006. (+)-N-deoxymilitarinone a, a neuritogenic pyridone alkaloid from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Natural Products*, **69**, 436-438.
- Yurimoto, S., Hatano, N., Tsuchiya, M., Kato, K., Fujimoto, T., Masaki, T., Kobayashi, R., Tokumitsu, H. 2009. Identification and characterization of wolframmin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein. *Biochemistry*, **48**(18), 3946-55.
- Zimmermann, G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, **18**(9), 865-901.

ANEXO

TABLAS

Tabla A1. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de A (122) (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A2. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de B (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A3. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de C (2S, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A4. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de D (2S, 3S, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A5. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de E (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A6. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de F (2R, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A7. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de G (2S, 3R, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A8. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de H (2S, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A9. valores calculados de $[\alpha]_D^a$ para los ocho diastereoisómeros de la acremoxantona C (122) con los carbonos cabeza de puente β -orientados.

Tabla A10. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **A** (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A11. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **B** (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A12. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **C** (2S, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A13. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **D** (2S, 3S, 1'S, 11'S, 14'R).

Tabla A14. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **E** (2R, 3R, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A15. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **F** (2R, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A16. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **G** (2S, 3R, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A17. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de **H** (2S, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Tabla A18. Datos espectroscópicos de la acremonidina A (121) en CDCl_3 , (^1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz).

FIGURAS

Figura A1. Espectro de ^1H NMR de la acremonidina A (**121**), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura A2. Espectro de ^{13}C NMR de la acremonidina A (**121**), 125 MHz, CDCl_3 .

Figura A3. Espectro de ^1H NMR de la beauverolida I (**115**), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura A4. Espectro de ^1H NMR de la beauverolida I (**115**), 125 MHz, CDCl_3 .

Tabla A1. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de **A** (2*R*, 3*R*, 1'*S*, 11'*S*, 14'*R*).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	38.79	16.67	-64.18	-25.21	+575.33
2	0.334	22.06	16.66	-64.18	-25.2	+380.99
3	0.340	21.85	111.84	-174.97	-26.05	+380.92
4	0.548	15.39	111.81	-174.96	-26.06	+427.14
5	1.782	1.91	111.84	-174.98	-26.09	+577.01
Valor ponderado ^e						+467.22

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365261.6439 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el *n*-ésimo conformero.

Tabla A2. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de **B** (2*R*, 3*R*, 1'*S*, 11'*S*, 14'*R*).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	48.66	16.67	-64.18	-25.21	+660.34
2	0.309	41.77	16.66	-64.18	-25.2	+783.96
3	0.551	6.59	111.84	-174.97	-26.05	+663.37
4	0.559	2.01	111.81	-174.96	-26.06	+796.86
5	2.168	0.96	111.84	-174.98	-26.09	+763.61
Valor ponderado ^e						+715.91

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9442 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el *n*-ésimo conformero.

Tabla A3. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de C (2S, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	74.59	-163.93	-38.46	-37.98	+670.31
2	0.638	25.40	-163.55	-41.69	-38.17	+545.20
3	5.249	0.10	-164.37	-38.80	-37.82	+432.41
4	5.865	0.05	-163.72	-41.94	-38.08	+505.14
5	9.403	0.01	-163.83	-37.58	-37.54	+444.44
Valor ponderado ^e						+638.69

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365261.3922 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A4. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de D (2S, 3S, 1'S, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	86.84	75.57	-157.58	89.19	+675.38
2	1.118	13.15	73.38	-164.9	91.37	+716.56
3	5.735	0.01	74.48	-164.05	89.13	+635.59
4	8.284	0.00	86.09	-151.44	80.12	+593.01
Valor ponderado ^e						+680.79

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365250.9053 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A5. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de E (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	54.53	-69.58	167.66	-92.63	+501.68
2	0.267	34.73	-76.33	161.74	-88.77	+305.78
3	1.250	6.61	-79.88	155.53	-86.02	+379.36
4	1.529	4.13	-80.8	156.85	-84.11	+497.11
5	7.573	0.00	-69.15	167.85	-92.93	+513.18
Valor ponderado ^e						+425.37

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9379 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\Sigma^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A6. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de F (2R, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	67.98	164.99	40.1	37.14	+741.6
2	0.753	19.07	165.52	43.04	36.67	+627.95
3	1.180	9.28	166.98	45.44	36.78	+721.23
4	1.810	3.20	158.84	36.2	40.69	+687.6
5	2.957	0.46	168.55	47.09	34.47	+749.15
Valor ponderado ^e						+716.34

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365261.6439 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\Sigma^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A7. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de G (2S, 3R, 1'R, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	50.34	-163.55	-41.74	-38.11	+477.28
2	0.008	49.66	-164.23	-38.7	-37.92	+415.41
Valor ponderado ^e						+446.56

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.6731 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A8. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b ángulos diedros selectos^c y valores de $[\alpha]_D$ calculados por DFT^d para los conformeros más relevantes de H (2S, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	D_1^c	D_2^c	D_3^c	$[\alpha]_D$
1	0.000	80.98	77.92	-156.97	87.5	+615.43
2	0.858	19.02	75.04	-163.15	89.5	+664.65
3	11.013	0.00	77.73	-156.71	88.17	+525.61
Valor ponderado ^e						+624.79

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9442 kcal mol⁻¹. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cÁngulos diedros en grados D1: (C7C2C3H3), D2 (C15C2C3H3), D3 (H4C4C3H3). ^dValores de $[\alpha]_D$ calculados en grados [dm g/cm³]⁻¹ (DFT B3LYP/DGDZVP). ^eCalculado con la ecuación $\sum^i [\alpha]_D^i \times P^i$, en donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A9. valores calculados de $[\alpha]_D^a$ para los ocho diastereoisómeros de la acremoxantona C (122) con los carbonos cabeza de puente β -orientados.

Estereoisómero	Configuración Absoluta	$[\alpha]_D^b$
I	2R, 3R, 1'S, 11'R, 14'S	-624
J	2R, 3S, 1'S, 11'R, 14'S	-446
K	2S, 3R, 1'S, 11'R, 14'S	-716
L	2S, 3S, 1'S, 11'R, 14'S	-425
M	2R, 3R, 1'R, 11'R, 14'S	-680
N	2R, 3S, 1'R, 11'R, 14'S	-638
O	2S, 3R, 1'R, 11'R, 14'S	-716
P	2S, 3S, 1'R, 11'R, 14'S	-467

^aValores de $[\alpha]_D$ calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) en grados $[\text{dm g/cm}^3]^{-1}$.

^bCalculado con la ecuación $\sum_i [\alpha]_D^i \times P^i$, donde $[\alpha]_D^i$ es el valor teórico de $[\alpha]_D$ y P^i es la población del n -ésimo conformero.

Tabla A10. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H (3J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de A (122) (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	$J_{\text{C7-H3}}$	$J_{\text{C15-H3}}$	$J_{\text{H4-H3}}$
1	0.000	38.79	2.50	10.16	2.55
2	0.334	22.06	1.66	7.78	2.57
3	0.340	21.85	1.69	7.76	2.57
4	0.548	15.39	1.80	6.97	2.90
5	1.782	1.92	1.61	6.88	2.13
Valor ponderados ^c			2.0	8.40	2.50

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol^{-1} relativa al valor absoluto G para el mínimo global $-1365261.6439 \text{ kcal mol}^{-1}$, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A11. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de B (2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	48.66	3.45	4.92	6.2
2	0.309	41.77	2.89	5.16	5.68
3	0.551	6.59	2.25	4.86	5.58
4	0.559	2.01	2.51	4.85	5.65
5	6.056	0.96	2.59	4.95	5.98
Valor ponderados ^c			3.11	5.02	5.99

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9442 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A12. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de C (2S, 3R, 1'S, 11'S, 14'R).

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	74.1	4.83	3.19	6.23
2	0.638	22.3	4.92	3.23	6.2
3	5.249	2.11	4.83	3.13	6.23
4	5.865	0.98	4.92	3.2	6.21
5	9.403	0.01	4.73	3.36	6.17
Valor ponderados ^c			4.85	3.20	6.22

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9442 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A13. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de D (2S, 3S, 1'S, 11'S, 14'R).

Conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	86.84	2.07	9.2	3.12
2	1.118	13.15	2.01	8.52	2.83
3	5.735	0.01	2.45	9.98	2.9
4	8.284	0.00	2.01	7.8	3.42
Valor ponderados ^c			2.10	9.17	3.05

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365250.9053 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A14. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de E (2R, 3R, 1'R, 11'S, 14'R).

Conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	54.53	2.78	10.56	2.75
2	0.267	34.73	1.88	8.08	2.8
3	1.250	6.61	1.96	7.28	3.14
4	1.529	4.13	2.4	8.73	3.07
5	7.573	0.00	2.79	10.59	2.75
Valor ponderados ^c			2.40	9.41	2.81

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9379 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A15. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de F (2R, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	67.98	4.84	2.7	5.9
2	0.753	19.07	4.96	3.03	6.29
3	1.180	9.28	5.01	3.45	6.31
4	1.810	3.20	5.24	3.2	6.02
5	2.957	0.46	4.9	2.76	5.95
Valor ponderados ^c			4.89	2.85	6.02

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365261.6439 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i j^i \times P^i$, donde j^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A16. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de G (2S, 3R, 1'R, 11'S, 14'R)

Conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	50.34	4.88	3.17	6.22
2	0.008	49.66	4.92	3.23	6.21
Valor ponderados ^c			4.90	3.20	6.22

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.6731 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i j^i \times P^i$, donde j^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A17. Energías libres relativas calculadas por DFT,^a poblaciones al equilibrio,^b y comparación entre constantes de acoplamiento ¹H-¹³C and ¹H-¹H (³J)^c calculadas y experimentales, para los conformeros más relevantes de H (2S, 3S, 1'R, 11'S, 14'R).

Conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	J_{C7-H3}	J_{C15-H3}	J_{H4-H3}
1	0.000	80.98	2.08	7.78	2.99
2	0.858	19.02	2.00	8.50	2.85
3	11.013	0.00	3.09	8.21	3.13
Valor ponderados ^c			2.06	7.92	2.96

^aEnergía libre de Gibbs (DFT B3LYP/DGDZVP) en kcal mol⁻¹ relativa al valor absoluto G para el mínimo global -1365260.9442 kcal mol⁻¹, # frecuencias imaginarias = 0 para todos los conformeros. ^bEn porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cConstantes de acoplamiento molecular en Hz calculadas a partir de las estructuras (B3LYP/DGDZVP) con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es la constante de acoplamiento calculada (spin-spin) para cada conformero y P^i es la población para el n -ésimo conformero.

Tabla A18. Datos espectroscópicos de la acremonidina A (**121**) en CDCl₃, (¹H a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz).

Posición	δ_C	δ_C (Mult, <i>J</i> en Hz)
1		
2	145.0	
3	120.98	6.99 (d, <i>J</i> = 9.1)
4	125.1	7.06 (d, <i>J</i> = 9.1)
5	156.1	
6	128.0	
7	110.64	
8	198.0	
9	109.8	
10	156.2	
11	110.9	5.80 (s)
12	146.8	
13	115.9	
14	159.5	
15	169.2	
16	52.6	3.61 (s)
1'	72.9	5.94 (s)
2'	136.4	
3'	123.2	6.85 (s)
4'	147.6	
5'	119.4	6.79 (s)
6'	162.1	
7'	112.3	
8'	185.7	
9'	105.2	
10'	186.6	
11'	37.6	4.87 (d, <i>J</i> = 6.6)
12'	131.9	6.43 (dd, <i>J</i> = 8.3, 6.6)
13'	132.1	6.08 (dd, <i>J</i> = 8.3)
14'	41.4	
15'	34.6	2.71 (d, <i>J</i> = 17.6) 2.57 (dd, <i>J</i> = 19.2)
16'	22.1	2.36 (s)
17'	170.5	
18'	21.1	1.99 (s)
OH-2		
OH-5		10.36
-OH 6		
-OH 10		
-OH 6'		11.57
-OH 8'		14.15

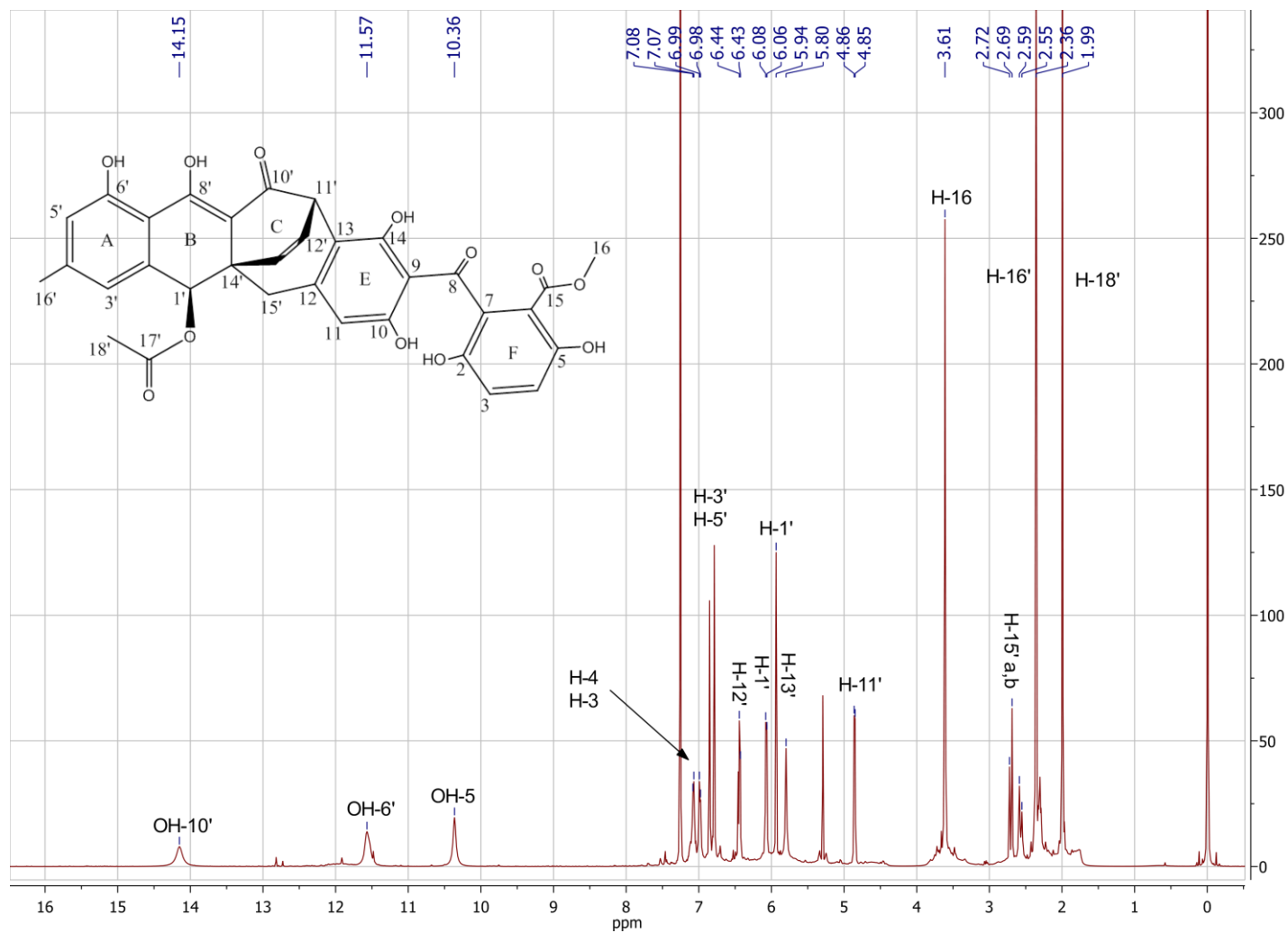


Figura A1. Espectro de ^1H NMR de la acremomidina A (121), 500 MHz, CDCl_3 .

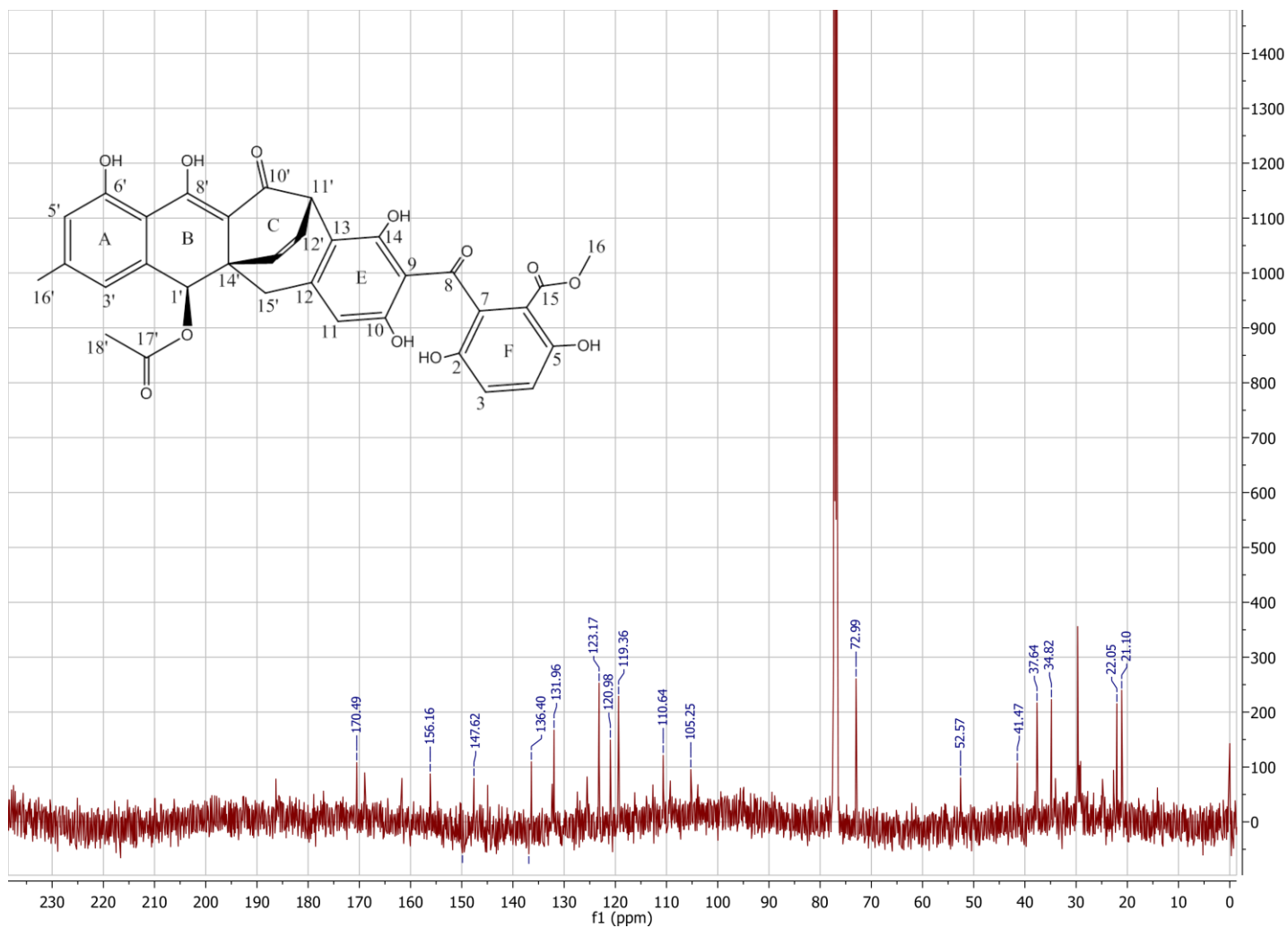


Figura A2. Espectro de ^{13}C NMR de la acremonidina A (121), 125 MHz, CDCl_3 .

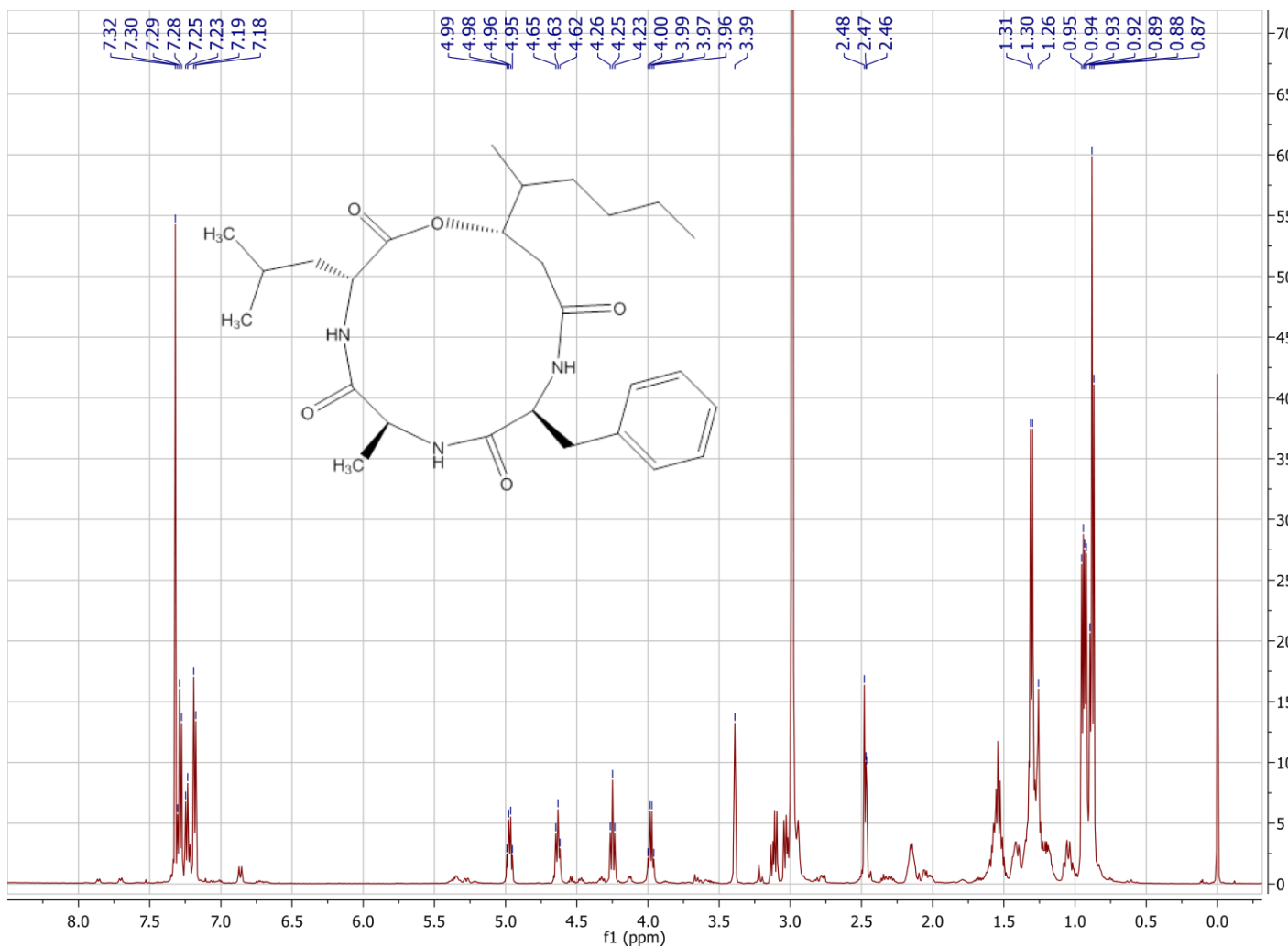


Figura A3. Espectro de ^1H NMR de la beauverolida I (115), 500 MHz, CDCl_3 .

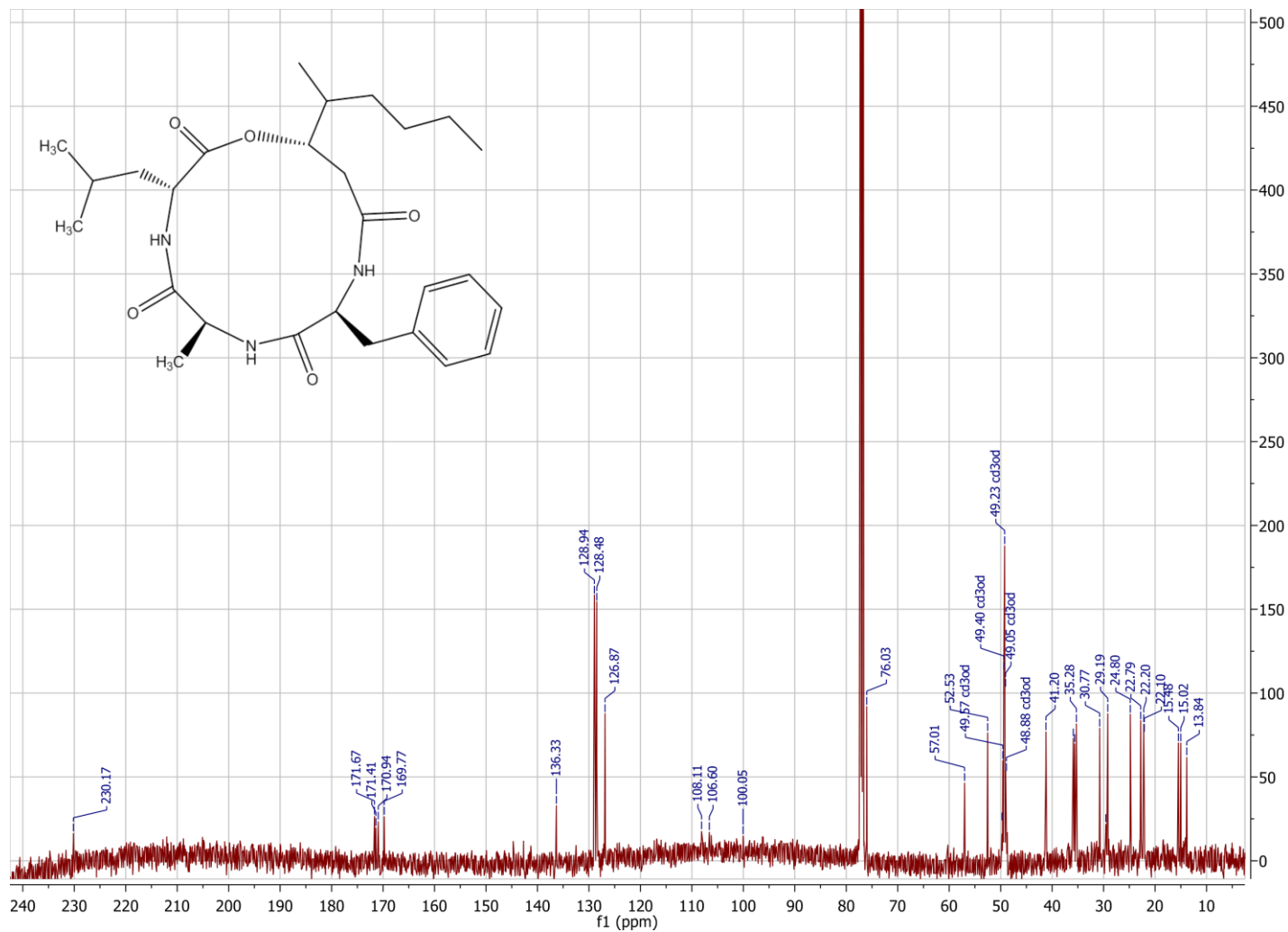


Figura A4. Espectro de ^1H NMR de la beauverolida I (115), 125 MHz, CDCl_3 .

ARTICULOS

Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., Mata, R. 2014. Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamides. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Aceptado.

Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., Toriello, C., Navarro-Barranco, H., Mata, R. 2014. Potent anti-calmodulin activity of cyclotetradepsipeptides isolated from *Isaria fumosorosea* using a newly designed biosensor. *Natural Product Communications*. Aceptado.

Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., González, M.D.C., Glenn, A.E., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. 2013. Absolute configuration of acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Natural Products*, 76 (8) 1454-1460.

Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide

Abraham Madariaga-Mazón^a, Oswaldo Hernández-Abreu^b, Samuel Estrada-Soto^b and Rachel Mata^a

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México and ^bFacultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

Keywords

calmodulin; endothelial nitric oxide synthase; malbrancheamides; vasorelaxation

Correspondence

Rachel Mata, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510, México.
E-mail: rachel@unam.mx

Received July 1, 2014

Accepted October 5, 2014

doi: 10.1111/jphp.12346

Abstract

Objectives This study was conducted to evaluate the vasorelaxant effect of the fungal alkaloids malbrancheamides on pre-contracted rat aorta rings. Also, we explored the probable mode of action using experimental and theoretical docking studies.

Methods The vasorelaxant effect was assessed on rat aorta rings pre-contracted with noradrenaline (0.1 μM). The mechanism of action was evaluated using different inhibitors of the pathways involved in the vasorelaxation process, such as L-NAME, indomethacin, tetraethylammonium and atropine. The docking analyses were carried out with AutoDock 4.2 software using the crystallized structure of the cyclooxygenase domain of eNOS.

Key findings Malbrancheamides (1–3) induced a significant vasorelaxant activity in a concentration- and endothelium-intact model in rat aorta rings, and a lesser effect in an endothelium-denuded model. Malbrancheamide-induced vasorelaxation was significantly weakened by pretreatment of endothelium-intact aortic rings with L-NAME (10 μM), indicating a nitrenergic relaxant mechanism. Docking analysis predicted that 1–3 could activate eNOS throughout an allosteric fashion at C1 and C2 pockets.

Conclusions Experimental evidence revealed that malbrancheamides induced both endothelium-independent and endothelium-dependent relaxant effects. According to theoretical studies, it is feasible that the endothelium-independent relaxation exerted by malbrancheamide could be mediated by its calmodulin inhibitory properties throughout an interference with myosin light chain phosphorylation and a positive modulation of eNOS.

2

Introduction

Since the identification of nitric oxide (NO) as the endothelium-derived relaxing factor, its role as secondary intra- and intercellular messenger in several physiological and pathophysiological conditions has been thoroughly investigated.^[1,2] NO is physiologically produced by the catalysis of nitric oxide synthases (NOS), which are Ca²⁺-calmodulin (CaM)-dependent enzymes.^[3] There are three NOS isoforms, iNOS (inducible), nNOS (neuronal) and eNOS (endothelial), which are homodimeric, with each monomer containing an N-terminal oxygenase and a C-terminal reductase domain, connected by a CaM-binding site.^[4] All three isoforms have negligible NO synthase activ-

ity in the absence of CaM. In addition to Ca²⁺-CaM, eNOS requires different cofactors (e.g. NADPH, FMN, FAD, BH4) for sustained action. Upon eNOS binding to Ca²⁺-CaM, the electron transfer rate from NADPH (reductase domain) to the heme centre (oxygenase domain) increases, promoting NO synthesis.^[5]

NO is an ubiquitous mediator in many different biological processes, such as neurotransmission, macrophage-mediated cytotoxicity, vascular and gastrointestinal smooth muscle relaxation, and bronchodilation, through a variety of downstream pathways.^[6] In large conductance vessels, such as aorta, endothelium-dependent vasodilation is

mainly attributed to NO production. It is well established that eNOS is the main isoform of NOS present in the vascular endothelium being the primary source of NO that plays an important role in the regulation of systemic blood pressure, blood flow and regional vascular tone.^[7] The mechanisms for NO to dilate the vascular smooth muscle have been demonstrated. Thus, NO diffuses from the endothelium into vascular smooth muscle where it stimulates soluble guanylate cyclase (sGC) to synthesize cGMP. This second messenger decreases intracellular Ca²⁺ levels throughout different mechanisms. The end effect of cGMP is relaxation of the vascular smooth muscle.^[8]

All major cardiovascular risk factors, individually or cooperatively, may alter endothelial function by impairing NO synthesis or by decreasing the bioavailability of this molecule at the vascular level.^[8] Reduced basal NO synthesis or action leads to vasoconstriction, elevated blood pressure and thrombus formation. In contrast, overproduction of NO leads to vasodilatation, hypotension, vascular leakage and disruption of cell metabolism.^[1] Thus, the discovery of new agents capable of influencing the generation of NO could lead to the discovery of new therapeutic treatments for such conditions. In this regard, natural products have served as important leads for the development of new drugs for the treatment of cardiovascular diseases.^[9–12]

Malbrancheamides are unusual indole-monoterpenoids alkaloids isolated from the coprophilous fungus *Malbranchea aurantiaca*;^[13,14] these compounds have been fully characterized as CaM ligands by NMR, fluorescence, circular dichroism, computational and enzymatic functional methods.^[15,16] The need for new therapeutic agents capable of influencing NO generation, and the fact that a few CaM inhibitors display smooth muscle relaxant activity, prompted us to determine the potential of malbrancheamides (1–3) as vasorelaxant agents. For this endeavour, we employed classical pharmacological assays and in-silico studies. The results demonstrated that malbrancheamides show potential as novel antihypertensive agents.

Materials and Methods

Chemicals and drugs

Carbamylcholine HCl (carbachol), noradrenaline HCl (NA), nifedipine, tetraethylammonium (TEA) and atropine were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). For the ex-vivo experiments, all compounds were dissolved with DMSO, and then diluted with distilled water.^[4] RP-HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument^[5] equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 247/365 nm, using a PurospherSTAR RP-18e column (4.6 mm × 250 mm) or a Merck Nucleosil C18 (10 × 250 mm; **, **). Control of equipment, data

acquisition processing and management of chromatographic information were performed by the Millennium 32 software package (Waters). TLC analyses were performed^[7] on silica gel 60 F254 plates (Merck), and visualization of plates was carried out using a Ce₂(SO₄)₃ (10%) solution in H₂SO₄.

Animals

All the experiments with animals were conducted according to the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with the International Guidelines on Care and Use of Laboratory Animals. Furthermore, clearance for conducting the studies was taken from the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing. Wistar rats weighing between 200 g and 300 g were fed a standard rodent diet *ad libitum* with free access to water and maintained under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycle, 25°C and humidity of 45–65%).

Rat aorta preparation

All animals were sacrificed by cervical dislocation, and the thoracic aorta was removed, cleaned and cut in about 3- to 5-mm length rings. In addition, for some aortic rings, the endothelium layer was removed by manual procedures. Then, each piece of tissue was suspended in a tissue chamber containing Krebs solution (composition, mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; EDTA, 0.026; and glucose, 11.1, pH 7.4) at 37°C, continuously gassed with O₂/CO₂ (9:1).

Vasorelaxant effect

The vasorelaxant activity was performed using a modified standard protocol of Saponara and co-workers.^[17] Tissues were placed under a resting tension of 3.0 g and allowed to stabilize for 60 min. The contractions were recorded with an isometrical force transducer Grass FT 03 (Astromed, West Warwick, RI, USA), connected to an MP100 Manager Biopac System polygraph (Biopac Instruments, Santa Barbara, CA, USA). After the stabilization period, the tissues were stimulated with NA (0.1 μM) during 10 min, and they were washed with fresh Krebs solution. This procedure was repeated three times at 30 min intervals before starting the experiments. The absence or presence of endothelium layer was confirmed by the lack of the relaxant response induced by carbachol (1 μM) in the last contraction to assess viability. Finally, all tissues were contracted with NA, and test samples (pure compounds (0.01–100 μM) or positive control (0.01–100 μM)) were added to the bath in quarter-log cumulative concentrations (evaluation period). The relaxant effect of the samples was determined

by its ability to induce a maximal vascular contraction before and after their addition.

Relaxant effect in the presence of L-NAME, atropine, TEA and indomethacin

To obtain evidence of the vasorelaxant mode of action exerted by malbrancheamides (0.01–100 μM), enzymatic inhibitors in endothelium signalling pathways throughout rat aorta ring assay were used. For this endeavour, 15 min before last NA stimulation, aorta rings were pre-incubated with L-NAME (10 μM), atropine (1 mM), TEA (5 mM) or indomethacin (10 μM) accordingly to each case. Then, the pure test compound was added at different concentrations and cumulative concentration–response curves were obtained.

Fungal material

The fungus was isolated from a soil collected in a cave in Juxtlahuaca (17° 25' 36" N, –99° 7' 34" W) State of Guerrero, Mexico in 1998. A reference sample (MEXU 26014) of the isolate was deposited at the Herbario Nacional de Mexico (MEXU). Stock cultures of the fungus are stored in potato-dextrose agar (PDA) and monthly sub-cultured for preservation.

Extraction and isolation of malbrancheamides

Fermentation, extraction and purification of malbrancheamide (1), malbrancheamide B (2) and isomalbrancheamide B (3) (structures shown in Figure 1) were undertaken as previously described.^[16] Briefly, 25 l of potato dextrose broth (PDB; Difco, **, **) were inoculated with 1 cm² agar plugs taken from a stock culture of *M. aurantiaca* on potato dextrose agar (PDA; Difco). After incubation (30 days), the combined organic extracts of mycelia and culture were obtained (12.0 g). Six grams of the extract were dissolved on CH₂Cl₂ and extensively parti-

tioned with HCl 1 N from the organic solution. Then, the acid extracts were basified with NH₄OH 1 N (pH 9) and extracted with CH₂Cl₂. The resulting organic fraction (591 mg) was resolved on a reverse phase Purospher STAR column eluting with MeCN (2.0 ml/min) to yield compounds 1 (199.2 mg; R_t 7.4 min), and a mixture of 2 and 3 (71.1 mg; R_t 6.3 and 6.5 min). The latter was resolved using a Nucleosil C18 column eluting with MeOH (2.0 ml/min) to give 2 (19.2 mg; R_t 7.05 min) and 3 (40.6 mg; R_t 7.6 min).

Statistical and data analysis

Data are expressed as the mean of experiments \pm SEM for the number ($n=6$) of animals used. Graphics were plotted and experimental data were adjusted by the non-linear curve-fitting programme Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance followed by Duncan's and post-hoc Tukey's tests. *P*-values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Molecular modeling

Minimum energy structures were built using the Spartan'02 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). All structures were geometrically optimized using DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory employing the Gaussian 09 programme (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA). All calculations were carried out on the KanBalam cluster, a parallel supercomputer with Linux operating system of distributed memory, containing 1368 AMD Opteron processors, around 3 terabytes of RAM memory, and 160 terabytes of storage (<http://www.super.unam.mx/>).

Docking studies

The docking studies were carried out with AutoDock 4.2 programme (<http://www.autodock.scripps.edu/>). The crystallographic structures of the different domains of eNOS were obtained from the Protein Data Bank (RCSB; pdb codes 3NOS and 3HR4). Addition of polar hydrogen atoms, Kollman charges and solvation parameters to the protein were performed through the AutoDock tools 1.5.4 package (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). Fully optimized structures of the ligands by DFT were taken as starting geometries and prepared by assigning the Gasteiger-Marsilli atomic charges and non-polar hydrogens using AutoDock tools 1.5.4. Docking was achieved using the default parameters as implemented in the software, except for the number of runs (1000), and the Lamarckian genetic algorithm with local search, and 25 000 000 energy evaluations per run. Initially, a blind docking was conducted with grid box size set at 115 Å \times 110 Å \times 150 Å in the *x*, *y* and *z* dimensions, with grid spacing set at 0.525 Å and the protein as the centre of

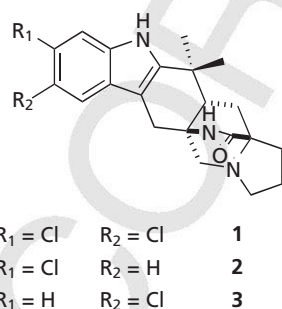


Figure 1 Chemical structures of malbrancheamide (1), malbrancheamide B (2) and isomalbrancheamide B (3).

the grid. A refinement procedure (grid box set to $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$) with the centre of the grid corresponding to the ligand at the pose with the least energy obtained in the blind docking was performed. The obtained docked poses were analysed with AutoDock tools^[18,19] using cluster analysis, PyMOL.^[20] A validated protocol was used to reproduce correctly the position and conformation of the co-crystal ligand into the catalytic binding site (*L*-arginine into the 3NOS *e*NOS crystal structure). Only the pose with the lowest energy value for each ligand was analysed.

Results

Relaxant effect of malbrancheamides

According to the results, the three alkaloids malbrancheamide (1), malbrancheamide B (2) and isomalbrancheamide B (3) induced a significant vasorelaxant activity in a concentration and endothelium-dependent manner (EC_{50} values of 2.74, 33.28 and $25.49 \mu\text{M}$, respectively) on NA pre-contracted ($0.1 \mu\text{M}$) rat aortic rings. However, the three alkaloids were less potent than carbachol (a muscarinic acetylcholine receptor agonist) and nifedipine (a calcium channel blocker) used as positive controls in aortic rings E+ and E-, respectively. In all endothelium-intact experiments, the maximal response was almost 100% of relaxation (E_{max} values of 99.97 ± 1.95 , 98.08 ± 0.56 and $100.42 \pm 0.66 \%$, for 1, 2 and 3, respectively), in comparison with carbachol (E_{max} of $74.06 \pm 5.7 \%$), but in a lesser extent in endothelium-denude experiments, where the maximal response was under 60% for the three alkaloids (Figure 2 and Table 1).

Role of L-NAME, indomethacin, atropine and TEA on relaxation induced by malbrancheamide

Pretreatment of endothelium-intact aortic rings with L-NAME (an NO synthase inhibitor, $10 \mu\text{M}$) produced a significant change of the response, and malbrancheamide-induced vasorelaxation was considerably weakened (E_{max} of $44.01 \pm 4.04\%$). Nevertheless, pretreatment of tissues with indomethacin ($100 \mu\text{M}$, a cyclooxygenase inhibitor), atropine ($1 \mu\text{M}$, an anticholinergic agent) or TEA ($5 \mu\text{M}$, a non-selective K^+ channel blocker) did not show a significant influence in the relaxant effect of malbrancheamide (Figure 3 and Table 2).

Molecular docking

The strategy applied involved the validation of the docking protocol with *L*-arginine, which was subtracted from the co-crystallized structure of *e*NOS and docked again to the cyclooxygenase domain; the result was a successful prediction of the pose of the ligand into the catalytic site

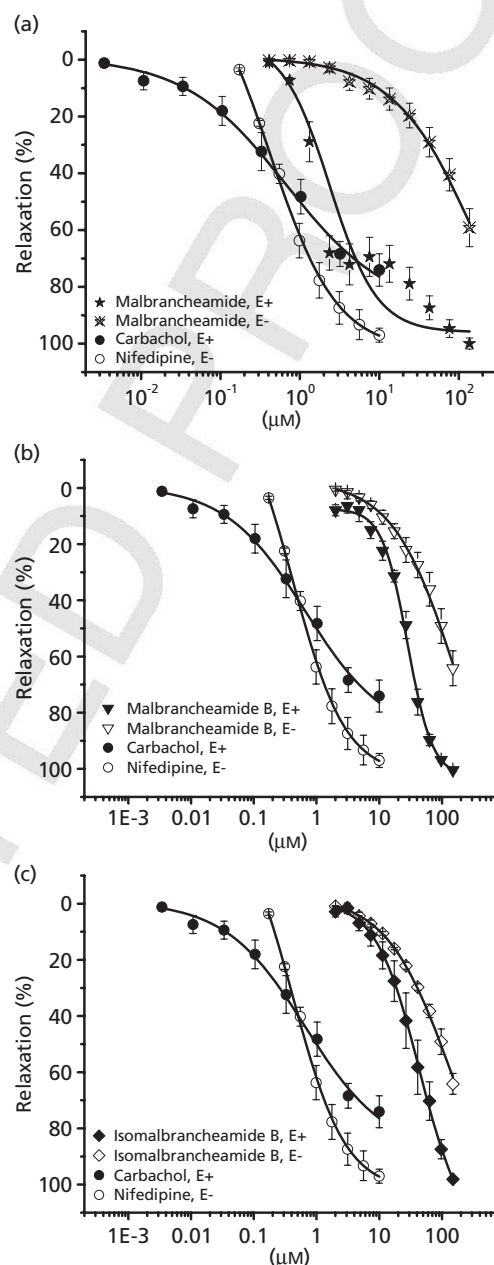


Figure 2 Vasorelaxant effect of (a) malbrancheamide (1), (b) malbrancheamide B (2) and (c) isomalbrancheamide B (3) on intact (E+) and endothelium-denuded (E-) rat aortic rings pre-contracted with noradrenaline. Values are expressed as the percentage of inhibition of contractile responses calculated as the mean \pm SEM from six animals, $P < 0.05$.

(Figure S1). Next, with *L*-arginine subtracted from the catalytic site, a blind docking was undertaken on this domain with 1–3. In all cases, the site of interaction comprised the polar residues tyrosine (Tyr), asparagine (Asn) and glycine (Gln); the hydrophobic contacts phenylalanine (Phe) and

Table 1 Values of E_{max} and EC_{50} for compounds **1–3** on intact and endothelium-denuded rat aortic rings

Compound	Endothelium-intact (E+)		Endothelium-denuded (E-)	
	E_{max} (%)	EC_{50} (μ M)	E_{max} (%)	EC_{50} (μ M)
1	99.97 \pm 1.95	2.74	59.13 \pm 6.68	42.07
2	98.08 \pm 0.56	33.28	64.14 \pm 3.73	44.68
3	100.42 \pm 0.66	25.49	64.17 \pm 6.21	47.52
Carbachol ^a	74.06 \pm 5.7	0.42	–	–
Nifedipine ^b	–	–	97.00 \pm 2.48	0.65

^aPositive control for E+ experiments. ^bPositive control for E- experiments. EC_{50} (μ M) values are presented as the means \pm SEM, $n = 6$.

proline (Pro); and the charged residues aspartic acid (Asp) and arginine (Arg). Figure 4 shows the theoretical binding model for malbrancheamide, malbrancheamide B and isomalbrancheamide B on the X-ray structure of the eNOS.

Next, a docking study using the CaM-binding domain of eNOS in complex with Ca^{2+} -CaM was performed (PDB code 1NIW). The results showed that **1–3** had higher binding energies (-7.16 kcal/mol) for the complex Ca^{2+} -CaM-peptide than for the oxygenase domains (-8.73 kcal/mol) (Figure S2).

Discussion

Malbrancheamides are rare indole-monoterpenoid alkaloids with a diazoctane core obtained from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. The potent anti-calmodulin activity of the three alkaloids has been thoroughly described in previous works.^[16] Calmodulin is one of the major cellular Ca^{2+} -binding proteins involved in the regulation of a series of CaM-dependent enzymes, such as NO synthases, phosphodiesterases, ion channels and kinases, among others. These enzymes and the processes they modulate (e.g. NO production, MLC phosphorylation, and Ca^{2+} or K^+ channels close/opening) represent valuable targets for the discovery of new leads for drugs useful in the therapy of hypertensive disorders.

Thus, the vasorelaxant activity of malbrancheamides (**1–3**) was investigated using NA (0.1μ M) pre-contracted rat aorta rings. The alkaloids induced the relaxant effect mainly by and endothelium-dependent pathway with maxima effects of almost 100%, which is unusual for natural products. In the absence of functional endothelium, their effect was lesser but significant. Altogether the results revealed that the smooth muscle relaxant action could involve COX or NOS endothelium-dependent pathways, as well as non-endothelium mechanisms, such as calcium and potassium channels interference, α -adrenoceptors antagonism or Ca^{2+} -CaM complex inhibition, among others.^[11]

Indeed, experimental evidence obtained throughout the analysis of malbrancheamide (**1**) ruled out the COX pathway since in the presence of indomethacin, a COX inhibitor, the smooth muscle relaxant effect of malbrancheamide (**1**) was not affected. On the other hand, pre-incubation of the smooth muscle preparation with L-NAME (10μ M), a non-selective inhibitor of e-NOS, demonstrated that the vasorelaxant activity of the alkaloid was decreased significantly in the presence of the inhibitor. This finding strongly suggested that malbrancheamide (**1**) induced an endothelium-dependent relaxant effect on rat aorta throughout the NO-cGMP pathway.^[8]

Next, the participation K^+ -channels and a direct cholinergic action in the relaxation effect of compound **1** was investigated. The results ruled out these non-endothelium mechanisms since the vasorelaxation induced by malbrancheamide was not altered in the presence of TEA (a K^+ channel blocker) and atropine (anticholinergic agent), respectively. Although other mechanisms could be involved in the endothelium-independent relaxation, the fact that malbrancheamide (**1**) is a well characterized CaM ligand led us to postulate that its mode of action could implicate also an interference of the contractile proteins modulated by CaM, e.g. myosin light-chain kinase (MLCK). The contractile activity in smooth muscle is initiated by a Ca^{2+} -CaM-dependent self-phosphorylation of MLCK; upon CaM binding to MLCK, it self-phosphorylates and becomes active.^[21] Thus, any molecule with the ability to prevent the formation of CaM- Ca^{2+} -MLCK complex will lead to an inactivation of MLCK and in turn to a smooth muscle relaxant effect. In this context, González-Andrade *et al.*^[12] demonstrated by means of a CaM fluorescent biosensor that malbrancheamide (**1**) prevented the formation of the complex CaM- Ca^{2+} -MLCK. The alkaloid displaced MLCK from the complex with a dissociation constant (K_d) of 0.61μ M.^[22] The significance *in vivo* of this finding would be inhibition of myosin light chain phosphorylation with the subsequent vasorelaxant effect.

Molecular docking

In an attempt to gain more information about the possible nitrenergic mechanism of **1**, docking analysis was carried out with two crystallized eNOS domains, namely the oxygenase (PDB 3NOS) and CaM-binding peptide bound to CaM (PDB 1NIW). The study was extended to analogues **2** and **3** for comparative purposes. As shown in Table S1 and Figure 4, malbrancheamides (**1–3**) could bind to eNOS in a pocket different from the catalytic site. The amino acids involved in the interaction are located in the substrate access channel at C1 and C2 pockets, far away from the substrate-binding cavity. In these pockets, Ji *et al.*^[23] described exposed polar/charged residues and functional

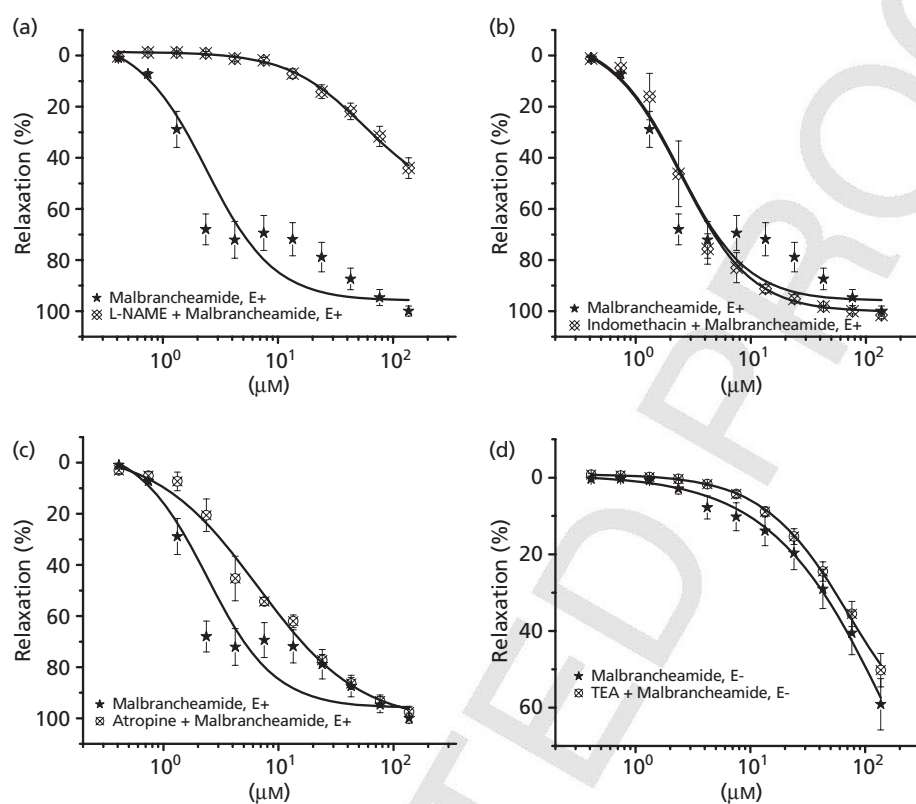


Figure 3 Relaxing concentration–response curves of malbrancheamide (**1**) on rat aorta rings pre-treated with (a) L-NAME, (b) indomethacin, (c) atropine and (d) tetraethylammonium pre-contracted with noradrenaline (0.1 μM). Data are expressed as the mean ± SEM of six experiments ($P < 0.05$).

Table 2 Pharmacological parameters in the determination of the mode of action of malbrancheamide (**1**)

Compounds	Endothelium-intact (E+)		Endothelium-denuded (E-)	
	E_{max} (%)	EC50 (μM)	E_{max} (%)	EC50 (μM)
L-NAME + 1	44.01 ± 4.04	ND	–	–
Indomethacin + 1	101.51 ± 1.41	2.75	–	–
TEA + 1	–	–	50.21 ± 4.36	43.03
Atropine + 1	97.55 ± 2.23	6.68	–	–

ND, non-determined. EC50 (μM) values are presented as the means ± SEM, $n = 6$.

groups of the cofactor which can form strong hydrogen bonds with ligands. In our results, **1–3** could have hydrogen-bonded with residues Asp478 (for **1**; H-bond = 2.0 Å) or Gln476 (**2** and **3**; H-bond = 1.8 Å). These interactions stabilized the ligands at the C1 pocket, contributing to a favourable binding energy (–8.73 kcal/mol). The free energy of binding (EFEB) calculated for the three alkaloids were very close, revealing that they could have a similar affinity to this binding site. Malbrancheamide

(**1**), which showed the best vasorelaxant effect, had the lower free energy binding. Taken together, these findings suggest that malbrancheamides could bind at C1 and C2 pockets of eNOS in an allosteric fashion promoting its activation. Similar results were previously found for dihydrospinochalcone-A and some triterpenes; however, the flavonoid bound only to C1.^[5,24]

The conformational changes caused by Ca²⁺-CaM-binding to eNOS (a short flexible alpha-helix amphiphilic peptide of 15–20 amino acids) are important in stimulating efficient electron transfer within the NOS enzymes. To explore whether malbrancheamides would preferably bind to Ca²⁺-CaM or to eNOS, a docking study using the co-crystallized structure of Ca²⁺-CaM bound to the Ca²⁺-CaM-binding peptide of eNOS (PDB 1NIW) was performed. The results led us to propose that the affinity of **1–3** to the eNOS oxygenase domain is higher than to the Ca²⁺-CaM-binding peptide; this finding could rule out any interference of malbrancheamide with the formation of Ca²⁺-CaM-eNOS complex and its consequent functionality.

Our previous experimental data revealing that malbrancheamide (**1**) had lower affinity ($K_d = 1.11$ μM) to CaM than CaM-binding peptide ($K_d = 0.040$ μM)^[25,26], as

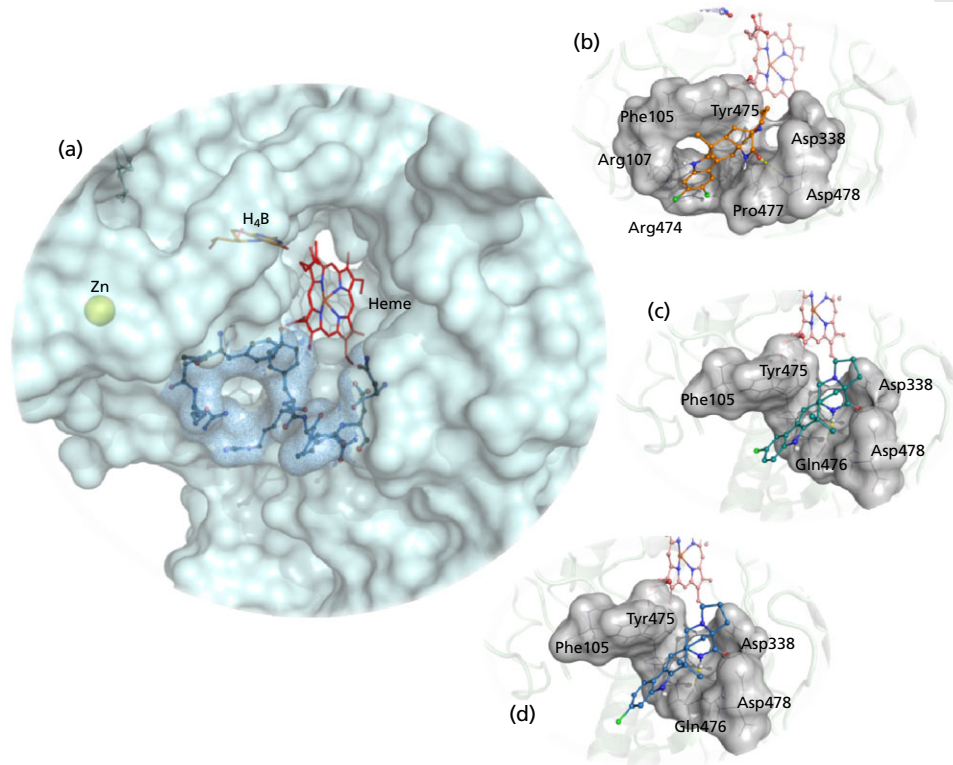


Figure 4 (a) Structural model of eNOS oxygenase domain (PDB code 3NOS) represented in pale blue surface showing the pocket of interaction of compounds **1–3** (sticks and surface in dark blue). Details about the binding model of (b) **1** in orange sticks, (c) **2** in pale green sticks and (d) **3** in blue sticks. Yellow dashes represent the hydrogen bonds in all cases. This figure was prepared using PyMOL.

well as the theoretical results obtained in the present work, tend to support that malbrancheamide induces vasorelaxation via the NO-*c*GMP pathway.^[8]

Conclusions

In summary, pharmacological testing of malbrancheamides revealed their smooth muscle relaxant properties; the mode of action of malbrancheamide (**1**), the most active alkaloid, appeared to involve a stimulation of eNOS as well as Ca²⁺-CaM-dependent processes, such as inhibition of MLC phosphorylation.

Declarations

Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Moncada S, Higgs E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2009; 147: S193–S201.
2. Piazza M *et al.* Structure and dynamics of calmodulin (CaM) bound to nitric oxide synthase peptides: effects of a phosphomimetic CaM mutation. *Biochemistry* 2001; 51: 3651–3661.
3. Stefani HA *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: effect on inducible nitric oxide synthase. *Eur J Med Chem* 2012; 58: 117–127.

Funding


This work was supported by a grant from CONACyT (99395).

Acknowledgement

We thank Ramiro del Carmen, I. Rivero and A. Pérez for their valuable technical assistance. A. Madariaga-Mazón acknowledges a fellowship from CONACyT to pursue graduate studies. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the NES system.

4. Persechini A *et al.* Calmodulin-induced structural changes in endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 2013; 587: 297–301.
5. Ladurner A *et al.* 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(*E*)-propenylbenzofuran promotes endothelial nitric oxide synthase activity in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2012; 84: 804–812.
6. Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric-oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 307–316.
7. Capettini L *et al.* Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol* 2010; 643: 260–266.
8. Huai R *et al.* Vasorelaxing and antihypertensive effects of 7,8-dihydroxyflavone. *Am J Hypertens* 2014; 27: 750–760.
9. Hernández-Abreu O *et al.* Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 54–61.
10. Monteiro FS *et al.* Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. *J Ethnopharmacol* 2012; 141: 895–900.
11. Estrada-Soto S *et al.* Vasorelaxant effect of *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Valerianaceae) and its mode of action as calcium channel blocker. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 1167–1174.
12. Torres-Piedra M *et al.* Vasorelaxant effect of flavonoids through calmodulin inhibition: *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* approaches. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 542–546.
13. Ajay M *et al.* Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003; 74: 603–612.
14. Martínez-Luis S *et al.* Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron* 2006; 62: 1817–1822.
15. Figueroa M *et al.* Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Nat Prod Res* 2008; 22: 709–714.
16. Miller KA *et al.* Calmodulin inhibitory activity of the malbrancheamides and various analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 6479–6481.
17. Figueroa M *et al.* Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2011; 26: 378–385.
18. Saponara S *et al.* (+/-)-Naringenin as large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 1013–1021.
19. Huey R *et al.* A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* 2007; 28: 1145–1152.
20. Morris GM *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 1998; 19: 1639–1662.
21. Wallace AC *et al.* LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 1995; 8: 127–134.
22. Filenko A *et al.* Smooth muscle myosin light chain kinase, supramolecular organization, modulation of activity, and related conformational changes. *Biophys J* 1997; 73: 1593–1606.
23. González-Andrade M *et al.* Importance of the interaction protein-protein of the CaM-PDE1A and CaM-MLCK complexes in the development of new anti-CaM drugs. *J Mol Recognit* 2013; 26: 165–174.
24. Ji H *et al.* Computer modeling of selective regions in the active site of nitric oxide synthases: implication for the design of isoform-selective inhibitors. *J Med Chem* 2003; 46: 5700–5711.
25. Rios MY *et al.* Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *ex vivo* and *in silico* studies. *Fitoterapia* 2012; 83: 1023–1029.
26. Venema RC *et al.* Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 1996; 271: 6435–6440.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site: 

Validation of method (arginine re-docked into eNOS oxygenase domain), docking model for malbrancheamides with CaM-binding peptide of eNOS bound to CaM and docking results for interaction of 1–3 with eNOS. This material is available online.

Figure S1 Superposition of arginine (green stick and ball) and the co-crystallized arginine (orange ball and stick) re-docked into eNOS oxygenase domain (PDB code 3NOS; grey cartoon).

Figure S2 Docking model for malbrancheamide (orange stick and ball), malbrancheamide b (blue stick and ball) and isomalbrancheamide b (blue stick and ball) with CaM-binding peptide of eNOS bound to CaM (PDB code 2LL7).

Table S1 .. 

Potent Anti-Calmodulin Activity of Cyclotetradepsipeptides Isolated from *Isaria fumosorosea* Using a Newly Designed Biosensor

Abraham Madariaga-Mazón^a, Martín González-Andrade^b, Conchita Toriello^c, Hortensia Navarro-Barranco^c and Rachel Mata^{a,*}

^aDepartamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

^bDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

^cDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico.

rachel@unam.mx

Received: July 30th, 2014; Accepted: XX, 2014

Seven cyclotetradepsipeptides, namely beauverolides **C** (1), **F** (2), **I** (3), **J_a** (4), **L** (5), **M** (6), and **N** (7), were isolated from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. The beauverolides were evaluated as potential calmodulin (CaM) inhibitors using the newly designed CaM biosensor *hCaM* M124C-*AF*₃₅₀; these peptides displayed high affinity to the protein with dissociation constants (K_d) ranging from 0.078 μ M to 3.44 μ M. Beauverolide **J_a**, the only one containing a tryptophan residue in its structure, showed the highest affinity. The docking study predicted that beauverolides could bind to CaM in the same site of interaction as chlorpromazine, a well-known calmodulin ligand.

Keywords: Cyclotetradepsipeptides, Beauverolides, *Isaria fumosorosea*, Calmodulin, *hCaM* M124C-*AF*₃₅₀ Biosensor.

Calmodulin (CaM) is the primary Ca^{2+} signaling protein in eukaryotic cells. The protein is highly flexible allowing it to respond at different intracellular Ca^{2+} levels by changing its conformation. Thus, CaM differentially regulates the activity of more than 100 proteins involved in Ca^{2+} -dependent intracellular pathways. Small molecules with the ability to bind to CaM modify its function in different ways, either inhibiting or altering the interaction with other proteins. Some of these ligands may be used as antipsychotics, muscle relaxants, antidepressants, minor tranquilizers, and local anesthetics [1, 2].

In recent years, several compounds with extraordinary anti-CaM activity have been isolated from natural sources, including plants and some fungal species [3]. As part of our ongoing research for the discovery of new and more potent CaM ligands from natural sources [4a-d], we have studied *Isaria fumosorosea* Wize [syn: *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm.], an entomopathogen fungus currently used for the biological control of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) [5].

Bioassay-guided fractionation of the total extract was performed using the newly designed CaM biosensor *hCaM* M124C-*AF*₃₅₀, which showed higher quantum efficiency ($\phi = 0.842$) in comparison with the wild-type *hCaM* protein ($\phi = 0.025$). In addition, this fluorophore provides responses in the UV spectrum, making it

possible to test colorful organic extracts or pure compounds without interfering with the response of the biosensor.

Partitioning of the active organic extract led to the active polar fraction F_{ME} , which was composed of seven cyclotetradepsipeptides according to a UPLC-MS analysis. The use of semi-preparative liquid chromatography allowed separation and purification of the main components in the fraction, and comparative analyses of their ¹H, ¹³C NMR and IR spectra with those reported in the literature confirmed their identity as beauverolides **C** (1), **F** (2), **I** (3), **J_a** (4), **L** (5), **M** (6), and **N** (7). Compounds 1-7 have been previously reported in the genera *Beauveria* and *Paecilomyces* [6a-c].

Beauverolides represent a group of lipophilic and neutral cyclotetradepsipeptides containing linear and branched C₉- or C₁₁- β -hydroxy acid residues [7]. Beauverolides are not mycotoxins since they do not exhibit bactericidal, fungicidal, insecticidal or any other toxic effects; and, though they may play some role in insect immunomodulation, the essential biological function is not clearly understood [6c]. Beauverolides have been well characterized as inhibitors of lipid-droplet formation in macrophages, since they inhibit macrophage acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) activity, blocking the synthesis of cholesterol ester, and consequently lessening atherogenic lesions in mouse models of atherosclerosis [8a,b].



Rachel Mata received her M. Sc. and Ph.D. degrees from Purdue University in 1976 and 1979, respectively. Her Ph.D. research was on the chemistry of cactus alkaloids, and was directed by Professor Jerry McLaughlin. After postdoctoral appointments at the Institute of Chemistry of the National Autonomous University of Mexico, she moved to the School of Chemistry of the same University at the end of 1984 where she is currently the head of the Pharmacy Department. Her research projects are intended to isolate and characterize bioactive compounds from selected medicinal plants and fungi from Mexico in order to discover new leads for the development of new drugs and pesticide agents.

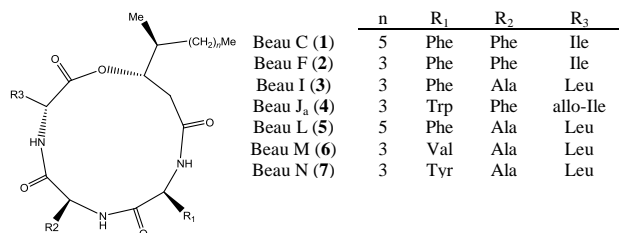


Figure 1: Structure of beaverolides isolated from *I. fumosorosea*.

The isolated cyclotetradepsipeptides were evaluated using the CaM biosensor *hCaM M124C-AF₃₅₀*, built-in with an Alexa Fluor® 350 C5-maleimide fluorophore. The fluorescent biosensors represent a powerful, fast, reliable and low-cost tool for detecting protein-ligand binding; moreover, the amounts of sample required for the assay are minimal [9a,b]. The results (Figure 2) revealed that beaverolides **1-7** interacted with CaM, with affinities (expressed as their dissociation constants, K_d) ranging from 0.078 to 3.44 μM . The most active compound, beaverolide J_a (**4**), was almost tenfold more active than chlorpromazine (CPZ), a well-known CaM classical inhibitor used as positive control.

The highest affinity of beaverolide J_a to CaM could be attributed to the presence of a tryptophan moiety in the molecule; this amino acid is more hydrophobic than the other amino acid residues

Table 1: Experimental and theoretical affinity constants to Ca²⁺-CaM (K_d , K_i respectively) of the beaverolides (**1-7**) and docking energy parameters.

Compound	K_d , μM^a	K_i , μM^b	EFEB ^b (kcal/mol)
1	0.300	1.37	-8.00
2	0.400	0.63	-8.45
3	0.190	9.70	-6.84
4	0.078	0.39	-8.74
5	1.660	1.08	-8.14
6	3.440	9.54	-6.85
7	1.740	5.55	-7.17
CPZ	0.790	1.85	-7.82

^aExperimentally determined with the biosensor *hCaM M124C-AF₃₅₀*.

^bEstimated Free Energy of Binding, calculated from the results of docking study using AutoDock 4.2.

(phenylalanine, valine and tyrosine) present in the related compounds.

In order to predict the site of interaction of **1-7** with Ca²⁺-CaM, a theoretical docking study was conducted using the software AutoDock 4.2 and AutoDockTools1.5 [10]. This software allows also the calculation of theoretical inhibition constant (K_i) from the docking energy parameters, which represents the degree of affinity.

CaM features four well-characterized regions rich in hydrophobic amino acid residues where most small-molecule ligands interact. Docking of beaverolides **1-7** into Ca²⁺-CaM (PDB code 1a29) suggested that, in all cases, they bind in the same pocket of chlorpromazine (Figure 3 for docking of **4**-Ca²⁺-CaM). The residues involved in the interactions of the cyclodepsipeptides **1-7** with Ca²⁺-CaM comprise Glu14, Ala15, Leu18, Phe92, Ile100, Leu105, Leu109, Glu114, Met124, Ile125, Glu127, Ala128, Phe141, and Met144. The binding forces in all cases were mainly hydrophobic in nature, since non hydrogen-bond formation was detected. According to the energy parameters shown in Table 1, the best theoretical affinity was displayed by **4**, in agreement with the experimental results.

Taken together, the experimental and theoretical results allow the beaverolides to be clustered into two groups according to their K_d and K_i constants. The first group includes those compounds whose R1 and R3 residues are alanine and isoleucine, respectively, *i.e.* beaverolides C, F and L. The second group comprises beaverolides N and M, in decreasing order of affinity, which possess alanine and leucine as residues R2 and R3, respectively. The length of the branched chain appears to have no relevance in the structure-activity relationship.

In summary, we isolated seven cyclotetradepsipeptides from *I. fumosorosea*, characterized by spectroscopic and spectrometric methods as beaverolides. All the fungal compounds showed significant anti-CaM activity, with affinity constants ranging from 0.078 μM to 3.44 μM . The predicted site of interaction was similar

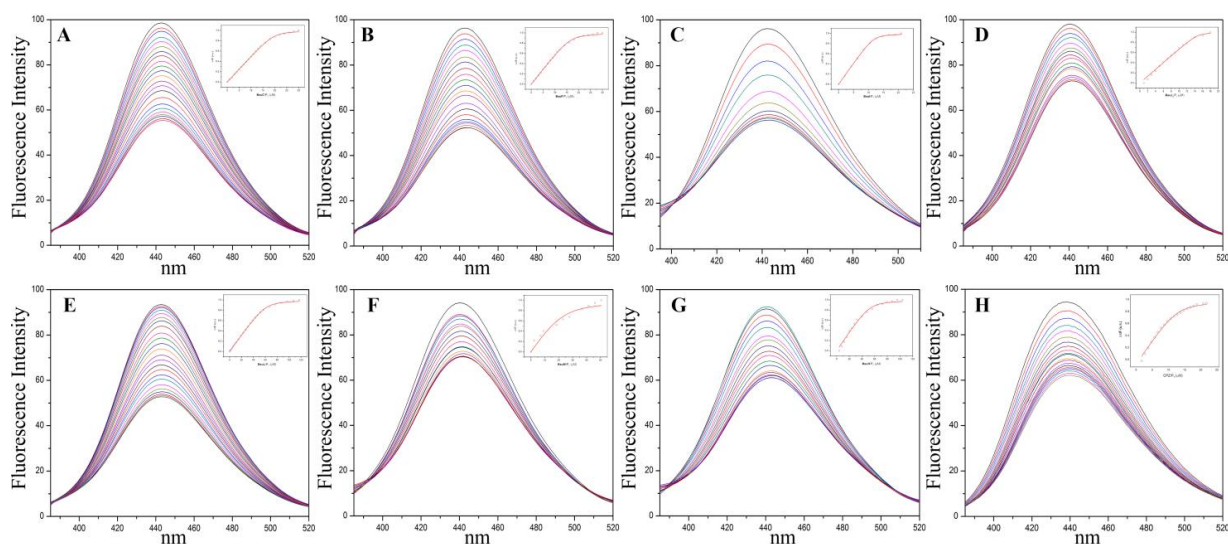


Figure 2: Fluorescence spectra and titration curves of *hCaM M124C-AF₃₅₀* (5 μM) to saturation ion Ca²⁺ (10 mM). (A) **1**, 0.30 μM . (B) **2**, 0.40 μM . (C) **3**, 0.19 μM . (D) **4**, 0.078 μM . (E) **5**, 1.66 μM . (F) **6**, 3.44 μM . (G) **7**, 1.74 μM and (H) CPZ, 0.79 μM . Buffer was 50 mM sodium acetate (pH 5.1) at 37 °C. Samples were excited at 257 nm, and emission spectra recorded from 375 to 550 nm. The absolute changes of maximal fluorescence emission were corrected for light scattering effects and plotted against the ligands to total protein ratio (insets)

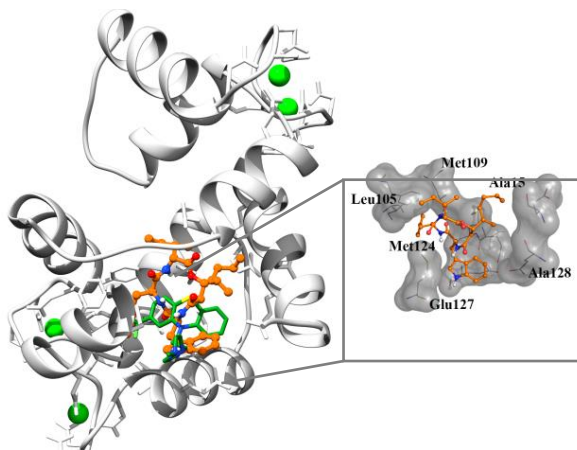


Figure 3: Structural model of Ca^{2+} -CaM complex represented in pale gray cartoon. The left panel shows the site of interaction of **4** (orange stick and ball) and trifluoroperazine (green sticks) with CaM, using the crystallographic structure of CaM (PDB code 1A29). Details about the binding model of **4** and the amino acids involved in the interaction (gray surface) with the ligand are shown to the right. This figure was prepared using PyMOL.

to that of CPZ. This investigation represents the first report of anti-CaM activity for cyclotetradepsipeptides.

Experimental

General experimental procedures: IR spectra were obtained using a Perkin-Elmer Spectrophotometer 400 FT-IR. NMR spectra, including HSQC and HMBC, were recorded in either CDCl_3 or DMSO-d_6 using a Varian Inova 500 spectrometer at 500 (^1H) and 125 MHz (^{13}C), with tetramethylsilane (TMSi) as an internal standard; chemical shifts were recorded as δ values. UPLC-MS analyses were acquired with a Waters UPLC-MS Synapt GS-2 (TOF) instrument, using an Acquity UPLC-BEH RP-C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 μm) set at 25°C, and a gradient starting with 50% MeCN in water (0.1% formic acid) to 10% in 15 min, and 90% over 1 min. Semi-preparative RP-HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 212/278 nm. Beauverolides were separated using a Merck @ Symmetry RP-18 column (7.8 mm x 300 mm, 7 μm) with 90% MeCN in water over 45 min. Control of equipment, data acquisition, processing and management of chromatographic information were performed by the Millennium 32 software package (Waters). TLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck), and visualization of plates was carried out using a $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ (10%) solution in H_2SO_4 .

Fungal material: The fungus was originally obtained from the National Centre for Biological Control (Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-CNRCB), Tecomán, Colima, México, and was originally isolated from *Bemisia tabaci* whitefly. A single spore culture (EH-505/3) was prepared according to a modified method of Goettel and Iglis [10]. The monospore culture was preserved in sterile water, mineral oil, and in liquid nitrogen cryopreservation at -196°C, and deposited in the fungal collection of the Laboratory of Basic Mycology of the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico. Stock cultures of the fungus are stored in potato-dextrose agar (PDA), and monthly sub-cultured for preservation.

Fermentation, extraction, and isolation: The fungus *I. fumosorosea* was grown in PDA Petri dishes for 15 days. The agar

was cut into pieces (1 cm^2) and inoculated in 6 2 L Fernbach flasks, each containing 1.8 L of potato-dextrose broth (PDB). Inoculated flasks were incubated at room temperature for 21 days in static conditions. After incubation, the culture media was subjected to successive partitions with CH_2Cl_2 and the separated mycelium was macerated with a mixture of CH_2Cl_2 -MeOH (9:1). The mycelia and broth extracts were combined according to their chromatographic homogeneity, and evaporated under reduced pressure to afford a yellowish extract (980 mg). The total extract was suspended in 500 mL of a mixture of MeCN-MeOH (1:1) and partitioned with *n*-hexane (5 x 350 mL). The combined MeCN-MeOH fractions were dried *in vacuo* and the resulting residue (350 mg) was washed with successive portions of MeOH. The dried extract was then subjected to RP-HPLC for separation of beauverolides.

Construction of hCaM M124C-AF₃₅₀ biosensor: hCaM M124C-AF₃₅₀ was built from the gene CALM1 (human phosphorylase kinase, delta) which encodes for hCaM, as described previously [9a], and labeled with the fluorophore AF₃₅₀ (Alexa Fluor® 350 C5-maleimide). The incorporation of AF₃₅₀ to the engineered protein (hCaM M124C-AF₃₅₀) provides higher quantum efficiency ($\phi = 0.842$) in comparison with wild-type hCaM ($\phi = 0.025$). In addition, this fluorophore provides responses in the UV spectrum, making colorful compounds not interfere with the response of the biosensor.

Steady-state fluorescence bioassay (hCaM-M124C-A350 biosensors): All measurements were conducted with an ISS-PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL) with sample stirring at 37°C. The fluorescent biosensor hCaM M124C-AF₃₅₀ (1 μM), was incubated in the buffer (50 mM of NaOAc [pH 5.1] and 10 μM of CaCl_2), then, after 5 min, the ligand dissolved in DMSO (10 nM) was added. Fluorescence emission spectra were acquired with excitation and emission slit widths of 4 and 8 nm, respectively. The excitation wavelength was 346 nm, and emission wavelengths were measured in a range of 370-550 nm. The fractional saturation (y) of the hCaMM124C-AF₃₅₀-ligand was calculated by changes in fluorescence upon ligand binding according to $y = (F - F_0)/(F_\infty - F_0)$, where F_∞ represents the fluorescence intensity at full saturation with the ligand, y is plotted as a function of the Ca^{2+} -CaM / inhibitor (L); the apparent dissociation constant (K_d) and stoichiometry (S) were obtained by fitting of the equation:

$$y = \frac{(1 + K_d/S + L/S) - \sqrt{(1 + K_d/S + L/S)^2 - 4L/S}}{2}$$

where y represents the fractional degree of fluorescence intensity at 445 nm, K_d is the apparent dissociation constant for the ligands, L is the complex-ligand relation, and S is the stoichiometry. Data were analyzed using the Origin software version 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Molecular modeling: Minimum energy structures were built using the Spartan '05 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). All structures were geometrically optimized using DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory employing the Gaussian 09 program (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA). All calculations were carried out on the Miztli cluster, a parallel supercomputer with Linux operating system of distributed memory, containing 5,312 Intel E5-2670 processors, around 23 terabytes of RAM memory, and 225 terabytes of storage (<http://www.super.unam.mx/>).

Docking studies: Theoretical docking studies were carried out with AutoDock 4.2 software (<http://www.autodock.scripps.edu/>). The

crystallographic structure of CaM was obtained from the Protein Data Bank (RCSB; pdb codes 1A29). Addition of polar hydrogen atoms, Kollman charges and solvation parameters to the protein, were performed through the AutoDock Tools 1.5.4 package (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). Fully optimized structures of the ligands were taken as starting geometries and prepared by assigning the Gasteiger-Marsilli atomic charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.4. Docking was achieved using the default parameters as implemented in the software, except for the number of runs (256), and the Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) with local search, and 25,000 000 energy evaluations per run. Initially, a blind docking was conducted with grid box size set at 120 Å x 110 Å x 110 Å in the *x*, *y* and *z* dimensions, with the protein as the center of the grid. A refinement procedure (grid box

set to 60 Å x 60 Å x 60 Å) with the center of the grid corresponding to the ligand at the pose with the least energy obtained in the blind docking was performed. The obtained docked poses were analyzed with AutoDockTools [10] using cluster analysis and PyMOL.

Acknowledgments - This work was supported by a grant from CONACyT (219765). We thank G. Duarte, M. Guzmán, M. Gutiérrez, I. Rivero, Ramiro del Carmen, and A. Pérez for their valuable technical assistance. A. Madariaga-Mazón acknowledges a fellowship from CONACyT to pursue graduate studies. We are indebted to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the Miztli system.

References

- [1] Menyhárd DK, Keserú GM, Náray-Szabó G. (2009) Calmodulin in complex with proteins and small molecule ligands: operating with the element of surprise. Implications for structure-based drug design. *Current Computer-Aided Drug Design*, **5**, 264-279.
- [2] Johnson CK. (2006) Calmodulin, conformational states, and calcium signaling. A single-molecule perspective. *Biochemistry*, **48**, 14233-14236.
- [3] Martínez-Luis S, Pérez-Vásquez A, Mata R. (2007) Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry*, **68**, 1882-903.
- [4] (a) Leyte-Lugo M, Figueroa M, González MDC, Glenn AE, González-Andrade M, Mata R. (2013) Metabolites from the endophytic fungus *Sporormiella minimoides* isolated from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, **96**, 273-278; (b) Madariaga-Mazón A, González-Andrade M, González, MDC, Glenn AE, Cerda-García-Rojas CM, Mata R. (2013) Absolute configuration of acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Natural Products*, **76**, 1454-1460; (c) González-Andrade M, Del Valle P, Macías-Rubalcava ML, Sosa-Peinado A, Del Carmen González M, Mata R. (2013) Calmodulin inhibitors from *Aspergillus stromatoides*. *Chemistry and Biodiversity*, **10**, 328-337; (d) Leyte-Lugo M, González-Andrade M, González MDC, Glenn AE, Cerda-García-Rojas CM, Mata R. (2012) (+)-Ascosalitinol and vermelhotin, a calmodulin inhibitor, from an endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*, **75**, 1571-1577.
- [5] Ayala MA, Reyes MR, Arroyo E, Calderón MC, Mier T, Robledo T, Toriello C. (2011) An *Isaria fumosorosea* SCAR marker for evaluation of soil, insect, and airborne samples. *Biocontrol Science and Technology*, **21**, 1091-1102.
- [6] (a) Jegerov A, Sedmera P, Matha V, Simek P, Zahradníčková H, Landa Z, Eyal J. (1994) Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, **37**, 1301-1303; (b) Kadlec Z, Šimek P, Heydová A, Jegerov A, Matha V, Landa Z, Eyal J. (1994) Chemotaxonomic discrimination among the fungal genera *Tolypocladium*, *Beauveria* and *Paecilomyces*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **22**, 803-806; (c) Jegerov A, Paizs B, Kuzma M, Zabka M, Landa Z, Sulc M, Barrow MP, Havlicek V. (2004) Extraribosomal cyclic tetradepsipeptides beauverolides: profiling and modeling the fragmentation pathways. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 949-960.
- [7] Kuzma M, Jegerov A, Kacer P, Havlicek V. (2001) Sequencing of new beauverolides by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **36**, 1108-1115.
- [8] (a) Tomoda H, Takayuki D. (2007) Discovery and combinatorial synthesis of fungal metabolites beauverolides, novel antiatherosclerotic agents. *Accounts of Chemical Research*, **41**, 32-39; (b) Doi T, Muraoka T, Ohshiro T, Matsuda D, Yoshida M, Takahashi T, Omura S, Tomoda H. (2012) Conformationally restricted analog and biotin-labeled probe based on beauverolide III. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 696-699.
- [9] (a) González-Andrade M, Figueroa M, Rodríguez-Sotres R, Mata R, Sosa-Peinado A. (2009) An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **387**, 64-70; (b) Gonzalez-Andrade M, Rivera-Chavez J, Sosa-Peinado A, Figueroa M, Rodriguez-Sotres R, Mata R. (2011) Development of the fluorescent biosensor *h*Calmodulin (*h*CaM)L39C-monobromobimane(*mBB*)/V91C-*mBB*, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**, 3875-3884.
- [10] Goettel MS, Inglis GD. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey LA. (Ed.), Academic Press, San Diego, USA, 213-249.
- [11] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, **19**, 1639-1662.

Absolute Configuration of Acremoxanthone C, a Potent Calmodulin Inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*

Abraham Madariaga-Mazón,[†] Martín González-Andrade,[‡] María del Carmen González,[§] Anthony E. Glenn,[⊥] Carlos M. Cerda-García-Rojas,^{*,||} and Rachel Mata^{*,†}

[†]Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, Mexico

[‡]Instituto Nacional de Medicina Genómica, Secretaría de Salud, México, D.F., 14610, Mexico

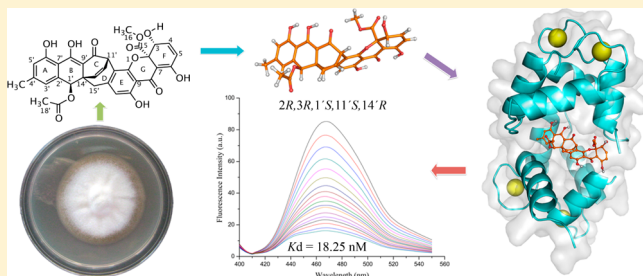
[§]Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, Mexico

[⊥]Toxicology & Mycotoxin Research Unit, 950 College Station Road, USDA-ARS, Russell Research Center, Athens, Georgia 30605, United States

^{||}Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, México D.F., 07000, Mexico

Supporting Information

ABSTRACT: Bioassay-guided fractionation of an extract prepared from the culture medium and mycelium of *Purpureocillium lilacinum* allowed the isolation of two calmodulin (CaM) inhibitors, namely, acremoxanthone C (1) and acremonidin A (2). The absolute configuration of 1 was established as 2*R*, 3*R*, 1'*S*, 11'*S*, and 14'*R* through extensive NMR spectroscopy and molecular modeling calculations at the DFT B3LYP/DGDZVP level, which included the comparison between theoretical and experimental specific rotation, ³J_{C,H}, and ³J_{H,H} values. Compounds 1 and 2 bind to the human calmodulin (*hCaM*) biosensor *hCaM* M124C-*mBBR*, with dissociation constants (*K_d*) of 18.25 and 19.40 nM, respectively, 70-fold higher than that of chlorpromazine (*K_d* = 1.24 μM), used as positive control. Docking analysis using AutoDock 4.2 predicted that 1 and 2 bind to CaM at a similar site to that which KAR-2 binds, which is unusual. Furthermore, a novel, sensible, and specific fluorescent biosensor of *hCaM*, i.e., *hCaM* T110C-*mBBR*, was constructed; this device is labeled at a site where classical inhibitors do not interact and was successfully applied to measure the interaction of 1 with CaM. This is the first report of xanthone–anthraquinone heterodimers in species of *Paecilomyces* or *Purpureocillium* genera.



Purpureocillium lilacinum (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson is a ubiquitous, saprobic filamentous fungus commonly isolated from soil, decaying vegetation, insects, nematodes, and other environments. This fungus is an emergent pathogen that causes severe human infections, but is used as an important biological control agent against nematodes.^{1–4} A recent comparative study of a few clinical isolates of this fungus with strains isolated from soil, insects, and nematodes using 18S rRNA gene, internal transcribed spacer (ITS), and partial translation elongation factor 1- α (TEF) sequences revealed that *P. lilacinum* is not related to *Paecilomyces*. Therefore, a new genus named *Purpureocillium* was proposed for the fungus, and the new combination *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson was made for this species.^{1–4}

A few metabolites have been isolated from *P. lilacinum*, including the neutral peptides regarded as paecilotoxins^{5,6} and the novel pyridone alkaloid paecilomide.⁷ The peptides exhibited moderate antimicrobial properties and strong uncoupling activity against rat liver mitochondria,^{5,6} while paecilomide was an inhibitor of acetylcholinesterase.⁷

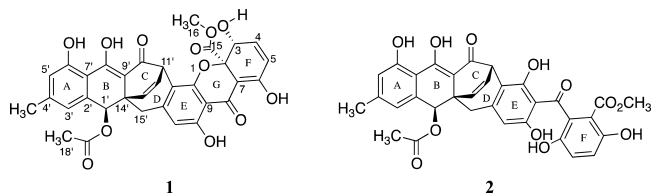
In our continuous search for calmodulin (CaM) ligands from fungi,^{8–12} we have now studied *P. lilacinum*, isolated from a soil sample of a cave in Juxtlahuaca, State of Guerrero, Mexico, and obtained two xanthone–anthraquinone heterodimers, namely, acremoxanthone C¹³ (1) and acremonidin A¹⁴ (2).

Calmodulin is a small (148 residues), acidic, and highly conserved protein, possessing homologous N- and C-terminal globular domains connected by a flexible central linker.¹⁵ Each globular domain contains two Ca²⁺ binding sites of the helix–loop–helix (EF-hand) type.¹⁶ Ca²⁺ binding to the protein induces the exposure of its hydrophobic patches, allowing binding to specific proteins and adopting a compact globular structure wrapped around its targets. Calmodulin interacts with many cellular targets to regulate their function, resulting in modulation of a large number of Ca²⁺-dependent signal transduction processes including gene regulation, protein synthesis, ion channel function, cell motility, organelle tubulation, chemotaxis, and smooth muscle contraction, to

Received: March 22, 2013

mention a few.¹⁷ Several synthetic or natural occurring compounds also bind to CaM in different domains, modifying its physiological function. Some of these compounds are used as valuable tools to study CaM-mediated pathways or as pharmacological agents for treating chronic or degenerative diseases.^{18,19} Thus, the discovery of new and more potent CaM inhibitors with a novel binding mode could lead to the discovery of new research tools or drugs with unique pharmacological properties.

Herein, we describe the isolation, absolute configuration, CaM binding properties, and docking studies of acremoxanthone A (**1**). Furthermore, a novel, sensible, and specific fluorescent biosensor of human CaM (*hCaM* T110C-*mBBR*), labeled at a site where classical inhibitors of the protein do not interact, was constructed and successfully applied to evaluate compounds **1** and **2**.



RESULTS AND DISCUSSION

An extract prepared from the culture medium and mycelium of *P. lilacinum* quenched the fluorescence of the CaM biosensor *hCaM* M124C-*mBBR*²⁰ by 50%, suggesting the presence of one or more CaM ligands. Reversed-phase liquid chromatography of the active extract allowed the isolation of two CaM ligands, acremoxanthone C (**1**) and acremonidin A (**2**). The structures of **1** and **2** were determined by spectroscopic and spectrometric analyses and comparison with reported data.^{13,14} Acremoxanthone C (**1**) was recently isolated from an unidentified fungus of the Hypocreales order. The characterization of **1** was achieved by NMR analysis; the relative configuration at C-1', C-14', and C-11' was designated on the basis of the ROESY experiment, which showed a correlation between the acetate C-18' methyl group and H-13'.¹³ All attempts to assign the absolute configuration at C-2 via the Mosher esters failed. In all cases, the G-ring opened under the basic conditions, yielding compound **2** and other minor products. Thus, the absolute configuration at C-2, C-3, C-1', C-14', and C-11' could not be unambiguously established.

The affinity of **1** and **2** for CaM was assessed using the fluorescent biosensor *hCaM* M124C-*mBBR*; the fluorescence titration curves (λ_{ex} 381 nm; λ_{em} 415–550 nm) of *hCaM* M124C-*mBBR* were assembled as depicted in Figure 1. The results showed that **1** and **2** bind to the protein with dissociation constants (K_d) of 18.25 ± 3.01 and 19.40 ± 3.15 nM, respectively, in a stoichiometric ratio of 1:1. These values were consistent with their higher affinity (70-fold) to the protein than CPZ ($K_d = 1.24 \mu\text{M}$), a well-known classic CaM inhibitor used as positive control. Compounds **1**, **2**, and CPZ quenched the fluorescence of the biosensor with values of 47%, 48%, and 90%, respectively. The level of affinity to CaM of **1** and **2** is unusual, since most CaM antagonists bind to the protein with much lower affinity, usually in the micromolar range.

Considering the extraordinary affinity of **1** to CaM, we decided to complete its structural characterization by establish-

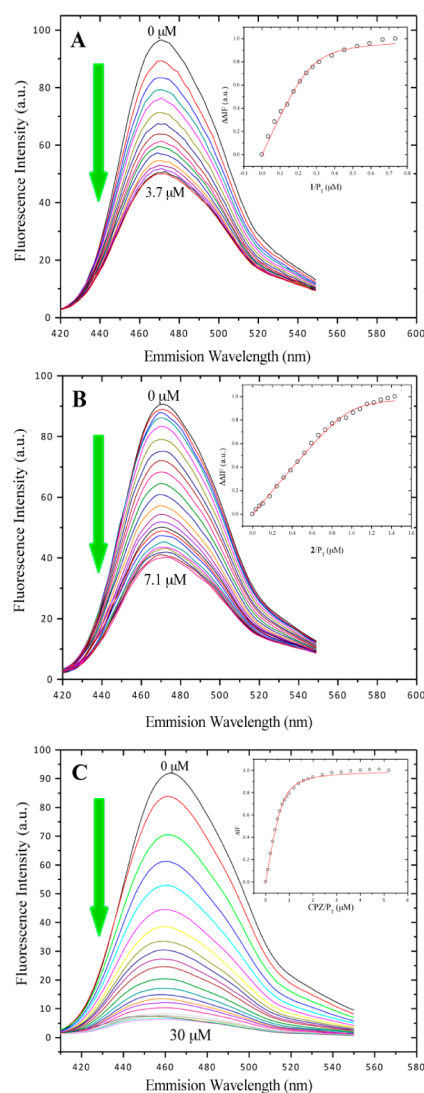


Figure 1. Fluorescence spectra and titration curves of *hCaM* M124C-*mBBR* (5 μM) to saturation ion Ca^{2+} (10 mM). (A) **1**, 18.25 nM; (B) **2**, 19.40 nM; and (C) CPZ, 1.24 μM . Buffer was 10 mM potassium acetate (pH 5.1) at 37 $^{\circ}\text{C}$. Samples were excited at 381 nm, and emission spectra recorded from 415 to 550 nm. The absolute changes of maximal fluorescence emission were corrected for light-scattering effects and plotted against the ligands to total protein ratio (insets).

ing its absolute configuration. Thus, molecular modeling calculations at the DFT B3LYP/DGDZVP level were undertaken^{21,22} in order to determine the calculated specific rotation and $^3J_{\text{C,H}}$ and $^3J_{\text{H,H}}$ values for all possible diastereoisomers of **1**. The calculated data were next compared with the experimental parameters.

Sixteen stereoisomers, in two enantiomeric series, are conceivable for **1**, since the bridgehead carbons (C-11' and C-14') can only be β - or α -oriented. The structure for each member of the β -series was built and minimized using the Spartan'02 software (Figures S1 and S2). For all diastereoisomers a conformational search was performed applying the molecular mechanics Monte Carlo protocol, followed by geometry optimization for each generated conformer using DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level, as implemented in the Gaussian 09 software. The optical rotation calculations were performed for each fully minimized conformer within an energy window of 0–3 kcal/mol (Tables S1–

S8). Once the results were Boltzmann-weighted, it was found that regardless of the absolute configuration of the C-2, C-3, and C-1' stereogenic centers, the eight isomers (A–H) possessing the bridgehead carbon atoms β -oriented (11'S,14'R) had positive $[\alpha]_D$ values, while those α -oriented (11'R,14'S) had negative values (Table S9). In this regard, all reported xanthone–anthraquinone heterodimers of the acromoxanthone series possess a β -oriented C-11'–C-14' bridgehead and positive $[\alpha]_D$ values. Thus, the biosynthesis of this type of compound seems to be restricted to the β -oriented C-11'–C-14' bridgehead isomers.^{14,23–25} The calculated specific rotation data of those isomers having positive values were compared with the experimental value recorded for **1**. According to the results in Table 1, the $[\alpha]_D$ value calculated

Table 1. DFT-Calculated $[\alpha]_D$ Values^a for the Eight Diastereoisomers of Acromoxanthone C (**1**) Possessing the Bridgehead Carbon Atoms β -Oriented

stereoisomer	absolute configuration	contributing conformers ^b	$[\alpha]_D$ ^c	difference ^d
A	2R, 3R, 1'S, 11'S, 14'R	5	+467.22	12.9
B	2R, 3S, 1'S, 11'S, 14'R	5	+715.91	33.3
C	2S, 3R, 1'S, 11'S, 14'R	5	+638.69	18.9
D	2S, 3S, 1'S, 11'S, 14'R	4	+680.79	26.8
E	2R, 3R, 1'R, 11'S, 14'R	5	+425.40	20.8
F	2R, 3S, 1'R, 11'S, 14'R	5	+716.34	33.4
G	2S, 3R, 1'R, 11'S, 14'R	2	+446.56	16.8
H	2S, 3S, 1'R, 11'S, 14'R	3	+624.79	16.4

^aDFT B3LYP/DGDZVP $[\alpha]_D$ values in degrees [dm g/cm³]⁻¹.
^bLowest free energy conformers whose contribution is approximately 99%.
^cCalculated with the equation $\sum_i [\alpha]_D^i \times P_i$, where $[\alpha]_D^i$ is the theoretical $[\alpha]_D$ value and P_i is the population for the i th conformer.
^dIn percentage, calculated with the equation $|([\alpha]_D^i / [\alpha]_D^o) \times 100 - 100|$, where $[\alpha]_D^i$ is the theoretical Boltzmann-weighted value for the corresponding isomer, and $[\alpha]_D^o$ is the experimentally observed value of $[\alpha]_D$ for **1** (+537.0).

for isomer A matched best with the experimental value for acromoxanthone C (**1**). This finding also implied that the absolute configurations at C-2, C-3, C-1', C-11', and C-14' were R, R, S, S, and R, respectively (Figure 2). Furthermore, the strong correlations between closely located H-1' and H-15' α (distance = 2.86 Å) and H-15' β (distance = 2.44 Å) in the NOESY spectrum of **1** provided additional evidence for the S configuration at C-1', ruling out stereoisomers E–H.

To reinforce the proposed stereochemical assignment for acromoxanthone A (**1**), a selection of experimental $^3J_{C,H}$ and $^3J_{H,H}$ coupling constants were compared with the theoretical values obtained by DFT calculations, also at the B3LYP/DGDZVP level of theory. This approach was selected due to the close correlation between the $^3J_{C,H}$ or $^3J_{H,H}$ coupling constants and the corresponding $^1H-C-C-^{13}C$ or $^1H-C-C-^1H$ dihedral angles.²² These values in combination with the pertinent molecular models provide accurate stereochemical information. Thus, experimental values for $^3J_{C,H}$ ($^3J_{C-7,H-3}$, $^3J_{C-7,H-5}$, and $^3J_{C-15,H-3}$) and $^3J_{H,H}$ ($^3J_{H-3,H-4}$) were measured in proton-coupled ^{13}C and 1H NMR spectra, respectively. The

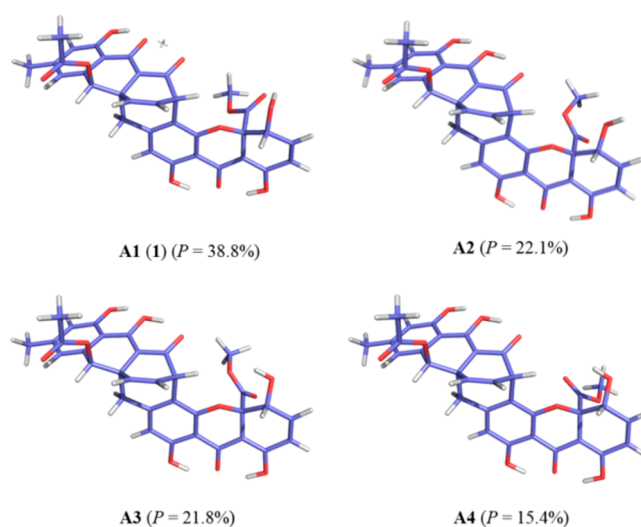


Figure 2. The most relevant DFT conformers of acromoxanthone C (**1**) accounting for 98.1% of the conformational population.

comparative analysis was performed only for stereoisomers A–D, which possessed a β -oriented C-11'–C-14' bridgehead and the appropriate distance between H-1' and H-15' α to observe an interaction in the NOESY spectrum. Once more, the best correlation between the theoretical and experimental values (Table 2) was observed for stereoisomer A (2R,3R,1'S,11'S,14'R), ruling out structures B–D (Figure S1) for acromoxanthone C (**1**). The Boltzmann-averaged $^3J_{C-7,H-3}$, $^3J_{C-15,H-3}$, and $^3J_{H-3,H-4}$ values for structure A were significantly closer to the experimental values than those for structures B–D. Thus, in the proton-coupled ^{13}C NMR spectrum of **1**, C-7 appeared as a broad doublet with $^3J_{C-7,H-3} \approx 1.5$ (measured at $W_{1/2}$) and $^3J_{C-7,H-5} = 3.9$ Hz, and the carbonyl carbon (C-15) was observed as a double quartet with $^3J_{C-15,H-3} = 7.6$ Hz and $^3J_{C-15,H-16} = 3.3$ Hz, in agreement with the calculated values for structure A. In addition, the $^3J_{H-3,H-4}$ value of 2.1 Hz observed in the 1H NMR spectrum of **1** provided further evidence in favor of stereostructure A, whose theoretical $^3J_{H-3,H-4}$ value was 2.5 Hz. In the case of stereostructures B and C the calculated $^3J_{H-3,H-4}$ values were 6.0 and 6.2 Hz, with RMSD values of 15.21 and 16.81, respectively, demonstrating a different geometry in the H-3–C-3–C-4–H-4 dihedral fragment. In addition, the large difference between the experimental $^3J_{C-15,H-3} = 7.6$ Hz and calculated values for stereoisomers B and C ($^3J_{C-15,H-3} = 3.3$ Hz and $^3J_{C-15,H-3} = 3.2$ Hz, respectively) as well as the larger difference between experimental and theoretical $^3J_{C-15,H-3} = 9.2$ Hz for stereoisomer D strengthened the selection of A as the structure for acromoxanthone C (**1**).

In order to predict the binding site to CaM of **1** and **2**, a theoretical molecular study of docking was undertaken using the program AutoDock 4.2.²⁶ The cocrystallized structure of CaM with TFP was used (PDB code 1A29). The docking of **1** and **2** with the cocrystallized structure of CaM–TFP showed a nonclassical interaction; that is, the binding pocket was different from that for CPZ and TFP, which occupy one or more protein domains, respectively. The predicted K_i 's were 406.9 and 367.6 nM, respectively. The predicted binding site for **1** and **2**, however, was similar to that of KAR-2, a vinblastine-derived antitumoral agent²⁷ that binds to CaM in a pocket between the N- and C-terminal globular domains like **1** and **2** theoretically do. KAR-2, **1**, and **2** seem to interact with

Table 2. Comparison between Selected Experimental^a and DFT-Calculated^b ¹H–¹³C and ¹H–¹H Couplings for Diastereoisomers A–D of Acremoxanthone C (1)

dihedral fragment X–C–C–Y	exp ³ J _{XY} ^a	calcd ^a ³ J _{XY} ^b for A (MSE) ^c	calcd ^a ³ J _{XY} ^b for B (MSE) ^c	calcd ^a ³ J _{XY} ^b for C (MSE) ^c	calcd ^a ³ J _{XY} ^b for D (MSE) ^c
C-7–C-2–C-3–H-3	1.5	2.0 (0.25)	4.9 (11.56)	4.9 (11.56)	2.1 (0.36)
C-15–C-2–C-3–H-3	7.6	8.4 (0.64)	3.3 (18.49)	3.2 (19.36)	9.2 (2.56)
H-3–C-3–C-4–H-4	2.1	2.5 (0.16)	6.0 (15.21)	6.2 (16.81)	3.1 (1.0)
	RMSD ^d	0.59	3.88	3.99	1.14

^aIn Hz measured from the proton-coupled ¹³C NMR or ¹H NMR spectra of **1** in CDCl₃. ^bCalculated from the B3LYP/DGDZVP-optimized structures and Boltzmann-averaged with the equation $\sum_i J^i \times P^i$, where J^i is the coupling constant value for each conformer and P^i is the population for the i th conformer. ^cMean-squared error calculated with the equation $(J_e - J_c)^2$, where J_e is the coupling constant value measured from the experimental spectra and J_c is the calculated constant value. ^dRoot-mean-square deviation, calculated from the equation $\sum_i (\text{MSE})_i / n$, where MSE_i is the mean-squared error for each coupling constant and n is the total coupling constants to compare.

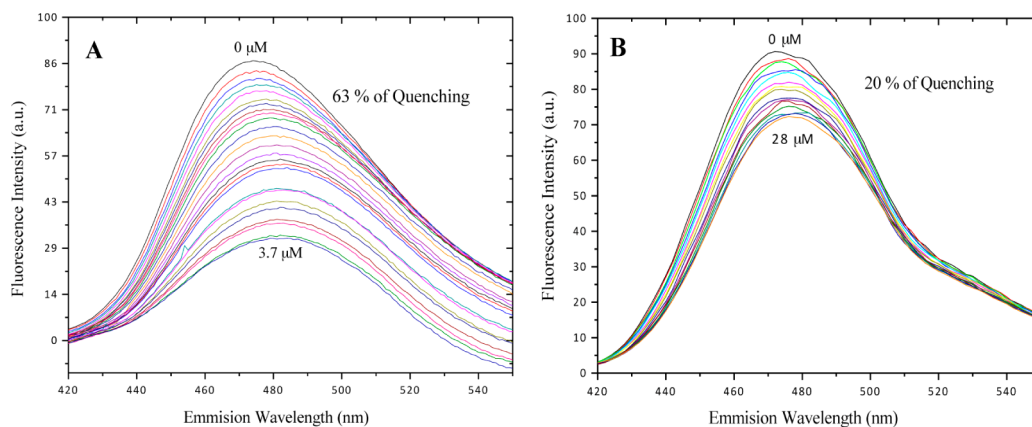


Figure 3. Fluorescence spectra of *hCaM T110C-mBBR* (5 μM; Ca²⁺ 10 mM) to saturation. (A) **1**, 63% of quenching. (B) CPZ, 20% of quenching. Buffer was 10 mM potassium acetate (pH 5.1) at 37 °C. Samples were excited at 381 nm, and emission spectra recorded from 415 to 550 nm.

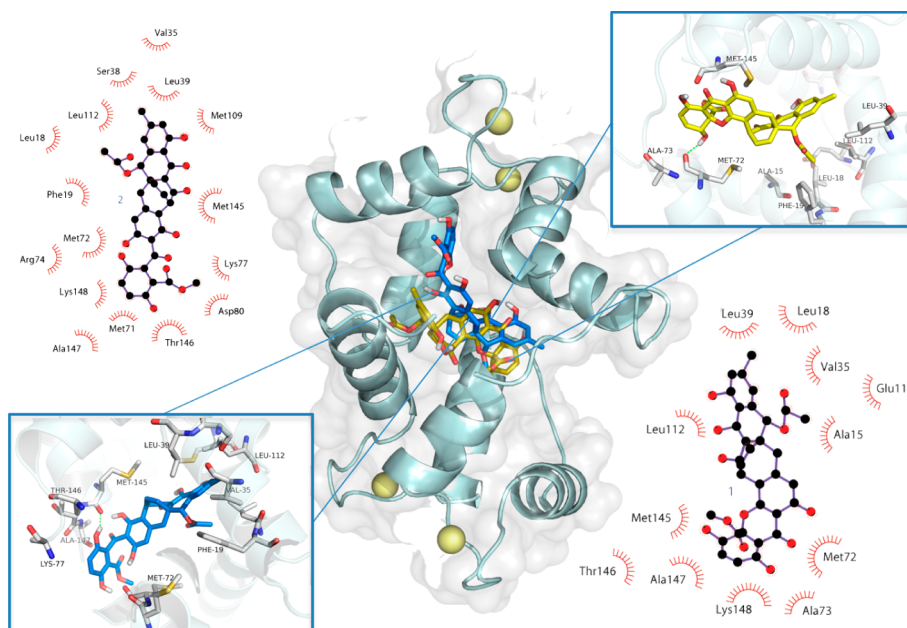


Figure 4. Structural model of CaM complexes represented in pale blue cartoon. The central panel shows the interaction of **1** (yellow sticks) and **2** (blue sticks) with CaM, using the crystallographic structure of the CaM (PDB code 1XA5). Details about the binding model of **1** and **2**, the amino acids involved in the interaction (white sticks) with the ligand, and hydrogen bonds (green dashed lines) are shown in the right and left panel, respectively. This figure was prepared using LigPlot and PyMOL.

several common amino acid residues, mainly hydrophobic, including Phe19, Ala15, Val35, Leu39, Gln41, Phe68, Ala73, Phe92, Met109, Leu112, Glu114, and Thr146; in addition, **1** forms a hydrogen bond between 3-OH and Met72 (distance = 1.9 Å), and **2** forms a similar interaction between 3-OH and

Met145 (distance = 3.8 Å). Both types of interactions (hydrophobic and hydrogen bonds) play an important role in the stabilization of the protein–ligand complex (Figure 4). A docking study using the CaM-KAR-2 crystallized structure (PDB 1XA5) confirmed this supposition (Figure S3).

Next, the affinity of **1** to CaM was measured with the newly designed *hCaMT110C-mBBr*, which was conceived for detecting nonclassical inhibitors of CaM. Device *hCaMT110C-mBBr* was generated following a conventional strategy that comprised site-directed mutagenesis for replacing the strategic residues Thr110 by Cys, followed by specific labeling of the thiol-reactive group with the fluorophore *mBBr*. This position was selected for labeling considering that residue 110 of CaM is in an accessible surface area ($ASA = 50.17 \text{ \AA}^2$) in the α -helix structure of CaM far from the binding site of classical inhibitors, and it is not involved in Ca^{2+} binding. The quantum efficiency of the *hCaM T110C-mBBr* device was $\phi = 0.303$. Next, fluorescence titration curves with *hCaM T110C-mBBr* were constructed with saturating concentrations of **1** and CPZ (3.1 and 7.1 μM) in the presence of Ca^{2+} (10 mM). The results indicated that the fluorescence quenching is about 63% and 20% for **1** and CPZ, respectively. Furthermore, a shift of fluorescence maximum to higher wavelengths (red-shift) is observed for compound **1**. The higher percentage of quenching and the fluorescence maximum displacement caused by **1**, in comparison with CPZ, revealed that it binds to the protein in a different site than classical inhibitors.²⁸ The last set of results provided experimental support concerning the unusual binding site of **1** to CaM as predicted by the docking study. Ligands that interact with a novel binding domain on CaM might not inhibit most of the modulatory properties of CaM. For example, Horváth et al. demonstrated that the drug KAR-2 interacted with a novel drug-binding domain on CaM, allowing the protein to interrelate with most of its physiological targets. Furthermore, they concluded that this feature confers to KAR-2 its specificity and lack of significant toxic side effects.¹⁹

In summary, compounds **1** and **2** interact with CaM with higher affinity than CPZ, which is a classical inhibitor of the protein. The differences in quenching and the fluorescence maximum displacement caused by **1**, in comparison with CPZ, as detected by the newly designed *hCaM T110C-mBBr*, revealed that it might bind to the protein in a different site than classical inhibitors. Indeed, docking studies predicted that the binding site of **1** and **2** is unusual, different from that of classical inhibitors, but similar to that of KAR-2. Thus, *hCaM T110C-mBBr* can efficiently detect nonclassical inhibitors of CaM, while *hCaM M124C-mBBr* is an efficient device for quickly identifying in a sensitive and reliable manner both classical and nonclassical ligands.^{12,24,29,12,30,31} This is the first report of xanthone–anthraquinone heterodimers in species of *Paecilomyces* or *Purpureocillium* genera.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. IR spectra were acquired using KBr disks in a Perkin-Elmer FT 59913 spectrophotometer. UV spectra were taken on a Shimadzu 160 UV spectrometer in CHCl_3 solution. The experimental optical rotations at the sodium D-line wavelength of pure compounds were recorded in CHCl_3 solution on a Perkin-Elmer 243 polarimeter at 23 °C. NMR spectra, including NOE differential, COSY, HMBC, and HSQC experiments, were recorded in CDCl_3 or methanol- d_4 on a Varian Unity Plus 500 spectrometer or on a Bruker DMX500 spectrometer operating at either 500 MHz (^1H) or 125 MHz (^{13}C), using TMS as an internal standard. RP-HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 247/365 nm, using a PurospherSTAR RP-18e column (4.6 mm \times 250 mm) and a gradient system starting with 50% MeCN in water, to 80% MeCN in 15 min, and 100% MeCN over 30 min, at a flow rate of 3.0 mL/min. Control of equipment, data acquisition and processing, and management of

chromatographic information were performed by the Millennium 32 software package (Waters). TLC analyses were performed on silica gel 60 F_{254} plates (Merck), and visualization of plates was carried out using a $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ (10%) solution in H_2SO_4 .

Fungal Material. The fungus was isolated from a soil collected in a cave in Juxtlaahuaca (17°25'36" N, 99°07'34" W), State of Guerrero, Mexico, in 1998. A reference sample (MEXU 26014) of the isolate was deposited at the Herbario Nacional de Mexico (MEXU). Stock cultures of the fungus are stored in potato-dextrose agar (PDA) and monthly subcultured for preservation.

Fermentation, Extraction, and Isolation. The fungus *P. lilacinum* was grown in PDA Petri dishes for 15 days; then the agar was cut into pieces (1 cm^2) and inoculated in six 1.8 L Fernbach flasks, each containing 1.4 L of potato-dextrose broth (PDB). Inoculated flasks were incubated at room temperature for 21 days in static conditions. After incubation, the contents of the flasks were combined and filtered through cheesecloth. The separated mycelium was macerated with a mixture of CH_2Cl_2 –MeOH (9:1), and the culture media was subjected to successive partitions with CH_2Cl_2 . The mycelia and broth extracts were combined according to their chromatographic homogeneity and evaporated under reduced pressure to afford a yellow, oily extract (980 mg). The total extract was suspended in 400 mL of a mixture of MeCN–MeOH (1:1) and partitioned with *n*-hexane (3 \times 350 mL). The combined MeCN–MeOH fractions were dried *in vacuo*, and the resulting residue (350 mg) was dissolved in MeOH and subjected to RP-HPLC separation on a semipreparative Purospher column to yield **1** (115 mg, t_R 26.2 min) and **2** (21 mg, t_R 21.9 min).

Acremoxanthone C: yellow solid; $[\alpha]_D^{25} +537$ (c 0.01, CHCl_3); UV (CHCl_3) λ_{max} (log ϵ) 244, 371 nm; IR ν_{max} (KBr) 3416, 2956, 1738, 1570, 1221 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 14.32 (1H, br s, OH 8'), 14.17 (1H, s, OH 6), 11.41 (1H, s, OH 6'), 11.10 (1H, s, OH 10), 6.88 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-3'), 6.79 (1H, dd, $J = 0.5, 1.5$ Hz, H-5'), 6.50 (1H, dd, $J = 2.1, 10.3$ Hz, H-4), 6.42 (1H, dd, $J = 6.6, 8.5$ Hz, H-12'), 6.13 (1H, s, H-11), 6.12 (1H, dd, $J = 2.8, 10.3$ Hz, H-5), 6.08 (1H, dd, $J = 1.1, 8.5$ Hz, H-13'), 5.96 (1H, s, H-1'), 5.29 (1H, dd, $J = 2.3, 2.8$ Hz, H-3), 4.80 (1H, dd, $J = 1.1, 6.6$ Hz, H-11'), 3.69 (3H, s, H-16), 3.65 (1H, br s, OH-3), 2.88 (1H, d, $J = 17.8$ Hz, H-15'a), 2.68 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-15'b), 2.37 (3H, s, H-16'), 1.98 (3H, s, H-18'), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 21.26 (CH_3 , C-18'), 22.22 (CH_3 , C-16'), 35.30 (CH_2 , C-15'), 38.27 (CH , C-11'), 41.63 (C, C-14'), 53.27 (CH_3 , C-16), 73.18 (CH , C-1'), 74.76 (CH , C-3), 84.83 (C, C-2), 99.18 (C, C-7), 105.56 (C, C-9), 105.76 (C, C-9'), 112.60 (C, C-7'), 114.36 (CH , C-11), 115.13 (C, C-13), 119.56 (CH , C-5'), 123.43 (CH , C-3'), 123.74 (CH , C-5), 131.91 (CH , C-12'), 132.66 (CH , C-13'), 136.50 (C, C-2'), 143.90 (CH , C-4), 147.73 (C, C-12), 147.91 (C, C-4'), 154.23 (C, C-14), 159.99 (C, C-10), 161.72 (C, C-6'), 168.87 (C, C-15), 170.57 (C, C-17'), 171.19 (C, C-6), 185.23 (C, C-8), 185.60 (C, C-8'), 186.27 (C, C-10').

Construction of *hCaM T110C-mBBr* Biosensor. Cloning and subcloning were done as previously reported using the pGEM-T Easy Vector System I and vector pET12b with restriction enzymes *NdeI* and *BamHI*.²⁰ Amino acid substitutions were generated by overlapping PCR mutagenesis using the Quick Change Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The amount of plasmid pET12b-*hCaM* was 100 ng, and the amount of mutagenic oligonucleotides was 125 ng. PCR amplification included 25 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing using a temperature ramp from 45 to 60 °C, a heating rate of 0.2 °C/s, and polymerization at 68 °C for 10 min, followed by one final extension step at 68 °C for 10 min. Oligonucleotides used to generate the single mutant T110C were 5'-CGT CAC GTC ATG TGT AAC TTA GG-3' and 5'-CCT AAG TTA CAC ATG ACG TGA CG-3'. After the mutagenesis experiments, the products of PCR amplification were digested with *DpnI* enzyme and transformed in *DH5 α* competent cells. The sequence of construction and mutation was confirmed by nucleotide sequencing with an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Plasmids (pET12b-*hCaM T110C*) were transformed into *E. coli* BL21-AI One Shot following the specifications of the kit's manufacturer.

Protein Purification of the Mutant hCaM T110C. A single colony of *E. coli* strain BL21-AI/pET12b-hCaM T110C was grown overnight in LB medium containing 100 mg/mL ampicillin with shaking at 37 °C and inoculated into 500 mL of LB medium containing 100 mg/mL ampicillin, until the optical density of the culture at 550 nm reached between 0.8 and 1.0. Expression was induced by the addition of L-(+)-arabinose (0.2% w/v) overnight with shaking at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation (10 min, 4000g), resuspended in 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 200 mg/mL egg white lysozyme at pH 7.5, and chilled on ice for 30 min. Resuspended cells were lysed by sonication, and cellular debris was removed by centrifugation for 15 min at 15000g. The supernatant was collected, and CaCl₂ and NaCl were added to final concentrations of 5 and 500 mM, respectively. The protein was purified using a Phenyl Sepharose CL-4B chromatographic column. Briefly, the supernatant was applied to the column pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM CaCl₂, and 500 mM NaCl at pH 7.5. The column was washed with loading buffer followed by the same with 1 mM EDTA and 150 mM NaCl. Finally, the protein was loaded on a cationic exchange column (Source Q, Amersham Biosciences) at pH 8.8 and eluted by a linear gradient of 40 min (0–100%) with 500 mM NaCl. Protein was collected in fractions and assessed for purity by gel electrophoresis.

Chemical Modification of Unique Reactive Cysteine of hCaM T110C Protein with mBBr. All fluorophore conjugation steps were typically carried out at room temperature. To protein at a concentration of 5–10 mg/mL was added 5 mM DTT by 12 h to reduce intramolecular disulfide bonds; then the mixture was washed on a gel filtration HR-100 column (Pharmacia, Biotech) to eliminate the excess DTT. A thiol-reactive fluorophore (20% in DMSO) was added in small aliquots to reach a final concentration of 10 molar excess and DMSO about 5%. Conjugation proceeded in the dark overnight at 4 °C with shaking. Separation of protein from unreacted fluorophore was achieved by size-exclusion chromatography (Superdex 75). The efficiency of report group attachment was assessed by the reactivity of the protein against 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid, measuring the release of 2-nitrobenzoate. Next, protein concentration of labeled hCaM was determined with the bicinchoninic acid method.³²

Steady-State Fluorescence Bioassay (hCaM M124C-mBBr and hCaM T110C-mBBr biosensors). All measurements were conducted with an ISS-PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL, USA) with sample stirring at 37 °C. The fluorescent biosensors hCaM M124C-mBBr and hCaM T110C-mBBr (1 mM), obtained as previously described,²⁰ were incubated in the buffer (50 mM NaOAc [pH 5.1] and 10 nM CaCl₂); then, after 5 min the ligand dissolved in MeOH (10 nM) was added. Fluorescence emission spectra were acquired with excitation and emission slit widths of 4 and 8 nm, respectively. The excitation wavelength was 381 nm, and emission wavelengths were measured in a range of 415–550 nm. The fractional saturation (*y*) of the hCaM M124C-mBBr-ligand and hCaM T110C-mBBr-ligand complexes was calculated by changes in fluorescence upon ligand binding according to $y = (F - F_0)/(F_\infty - F_0)$, where F_∞ represents the fluorescence intensity at full saturation with the ligand, and *y* is plotted as a function of the Ca²⁺-CaM/inhibitor (*L*); the apparent dissociation constant (K_d) and stoichiometry (*S*) were obtained by fitting of the equation

$$y = \frac{(1 + K_d/S + L/S) - \sqrt{(1 + K_d/S + L/S)^2 - 4L/S}}{2}$$

where *y* represents the fractional degree of fluorescence intensity at 470 nm, K_d is the apparent dissociation constant for the ligands, *L* is the complex–ligand relation, and *S* is the stoichiometry. Data were analyzed using Origin software version 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Molecular Modeling. Minimum energy structures were built using the Spartan'02 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). Conformational searching for the different isomers was performed using the Monte Carlo protocol as implemented in the same software,

under an MMFF94 molecular mechanics force field. The searching process was repeated at least twice, taking as starting point different geometries in order to achieve a wide range of conformational states. The resulting conformers were filtered according to their energies, leaving all duplicates out. In order to have a wide window of conformers in the Boltzmann distribution, an energy cutoff of 3 kcal/mol was selected. All conformers were geometrically optimized using DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory employing the Gaussian 09 program (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA). The optimized structures were used to calculate the thermochemical parameters and frequencies at 1 atm and 298 K. Magnetic shielding tensors were calculated with the gauge invariant atomic orbital method (GIAO), and coupling constants (¹H–¹H, and ¹³C–¹H) were obtained from the B3LYP/DGDZVP-optimized structures using the spin–spin option during the NMR calculations. The studies for determining theoretical optical rotation values were achieved at the same level of theory. Both properties were Boltzmann-weighted taking into account the DFT conformational population. All calculations were carried out on the KanBalam cluster, a parallel supercomputer with Linux operating system of distributed memory, containing 1368 AMD Opteron processors, around 3 terabytes of RAM memory, and 160 terabytes of storage (<http://www.super.unam.mx/>).

Docking Studies. The docking studies were carried out with the AutoDock 4.2 program (<http://www.autodock.scripps.edu/>). The crystallographic structures of CaM were obtained from the Protein Data Bank (RCSB; pdb codes 1A29, 1XA5). Addition of polar hydrogen atoms, Kollman charges, and solvation parameters to the protein was performed through the AutoDock Tools 1.5.4 package (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). Fully optimized structures of the ligands by DFT were taken as starting geometries and prepared by assigning the Gasteiger–Marsilli atomic charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.4. Docking was achieved using the default parameters as implemented in the software, except for the number of runs (1000), and the Lamarckian genetic algorithm (LGA) with local search and 25 000 000 energy evaluations per run. Initially a blind docking was conducted with grid box size set at 120 Å × 110 Å × 110 Å in the *x*, *y*, and *z* dimensions, with the protein as the center of the grid. A refinement procedure (grid box set to 60 Å × 60 Å × 60 Å) with the center of the grid corresponding to the ligand at the pose with the least energy obtained in the blind docking was performed. The obtained docked poses were analyzed with AutoDockTools^{26,33} using cluster analysis, PyMOL, and LigPlot.³⁴

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

DFT B3LYP/DGDZVP free energies, populations, theoretical averaged optical rotations, and theoretical averaged coupling constants for A–H. ¹H, ¹³C, and proton-coupled ¹³C spectra of compound 1. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(R.M.) Tel: 525-556225289. Fax: 525-556225329. E-mail: rachel@unam.mx. (C.M.C.-G.-R.) Tel: 525-557474035. E-mail: ccerda@cinvestav.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from CONACyT (99395). We thank G. Duarte, M. Guzmán, M. Gutiérrez, I. Rivero, and A. Pérez for their valuable technical assistance. A.M.-M. acknowledges a fellowship from CONACyT to pursue graduate studies. We are indebted to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, for providing the

resources to carry out computational calculations through the KanBalam system.

REFERENCES

- (1) Luangsa-ard, J.; Houbraken, J.; van Doorn, T.; Hong, S.-B.; Borman, A. M.; Hywel-Jones, N. L.; Samson, R. A. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *321*, 141–149.
- (2) Oclarit, E. L.; Cumagun, C. J. R. *J. Plant Protein Res.* **2010**, *49*, 337–340.
- (3) Demirci, F.; Denizhan, E. *Phytoparasitica* **2010**, *38*, 125–132.
- (4) Kiewnick, S.; Sikora, R. A. *Biol. Control* **2006**, *38*, 179–187.
- (5) Mikami, Y.; Yazawa, K.; Fukushima, K.; Arai, T.; Udagawa, S.; Samson, R. A. *Mycopathologia* **1989**, *108*, 195–199.
- (6) Khan, A.; Williams, K.; Nevalainen, H. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *227*, 107–111.
- (7) Teles, A. P. C.; Takahashi, J. A. *Microbiol. Res.* **2012**, 1–7.
- (8) Rivero-Cruz, J. F.; Macías, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 511–514.
- (9) Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, I.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1147–1155.
- (10) Martínez-Luis, S.; Rodríguez, R.; Acevedo, L.; González, M. C.; Lira-Rocha, A.; Mata, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1817–1822.
- (11) Figueroa, M.; González, M. D. C.; Rodríguez-Sotres, R.; Sosa-Peinado, A.; González-Andrade, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2167–2174.
- (12) Leyte-Lugo, M.; González-Andrade, M.; González, M. D. C.; Glenn, A. E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1571–1577.
- (13) Ayers, S.; Graf, T. N.; Adcock, A. F.; Kroll, D. J.; Shen, Q.; Swanson, S. M.; Matthew, S.; Carcache de Blanco, E. J.; Wani, M. C.; Darveau, B. A.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. *J. Antibiot.* **2011**, *65*, 3–8.
- (14) He, H.; Bigelis, R.; Solum, E. H.; Greenstein, M.; Carter, G. T. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 923–930.
- (15) Junker, J. P.; Rief, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 14361–14366.
- (16) Yosef, E.; Politi, R.; Choi, M. H.; Shifman, J. M. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1470–1480.
- (17) Yurimoto, S.; Hatano, N.; Tsuchiya, M.; Kato, K.; Fujimoto, T.; Masaki, T.; Kobayashi, R.; Tokumitsu, H. *Biochemistry* **2009**, *48*, 3946–3955.
- (18) Menyhard, D. K.; Keseru, G. M.; Náráy-Szabó, G. *Curr. Comput.-Aided Drug* **2009**, *5*, 264–279.
- (19) Horvath, I. J. *Biol. Chem.* **2004**, *280*, 8266–8274.
- (20) González-Andrade, M.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R.; Sosa-Peinado, A. *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 64–70.
- (21) Stephens, P. J.; Pan, J. J.; Devlin, F. J.; Cheeseman, J. R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 285–288.
- (22) López-Vallejo, F.; Fragosó-Serrano, M.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A. C.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6057–6066.
- (23) Tabata, N.; Tomoda, H.; Matsuzaki, K.; Omura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8558–8564.
- (24) Tabata, N.; Tomoda, H.; Iwai, Y.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 267–271.
- (25) Isaka, M.; Palasarn, S.; Auncharoen, P.; Komwijit, S.; Jones, E. B. *G. Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 284–287.
- (26) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (27) Harmat, V.; Böcskei, Z.; Náráy-Szabó, G.; Bata, I.; Csutor, A. S.; Hermecz, I.; Arányi, P.; Szabó, B.; Liliom, K.; Vertessy, B. G.; Ovádi, J. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 747–755.
- (28) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer: New York, 2006; p 86.
- (29) Martínez-Luis, S.; Pérez-Vásquez, A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1882–1903.
- (30) Figueroa, M.; González-Andrade, M.; Sosa-Peinado, A.; Madariaga-Mazon, A.; Del Río-Portilla, F.; González, M. D. C.; Mata, R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 378–385.
- (31) González-Andrade, M.; Rivera-Chávez, J.; Sosa-Peinado, A.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3875–3884.
- (32) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- (33) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–1152.
- (34) Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127–134.
- (35) This paper is taken in part from the Ph.D. thesis of A.M.