



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Efecto sobre el ciclo celular y la actividad antiinflamatoria de las argentatinas A y B, aisladas de *Parthenium argentatum* Gray (guayule) así como de algunos de sus derivados**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA**

I. Q. Juan Carlos Romero Benavides

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Mariano Martínez Vázquez  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**COMITÉ TUTORAL**

Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Dr. Jorge Meléndez Zajgla  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

México, D.F. Noviembre, 2015



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. Alejandro García Carranca

Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Vocal: Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Vocal: Dra. Patricia García López

Vocal: Dra. Nadia Edith Jacobo Herrera

Tutor: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Sustentante: I.Q. Juan Carlos Romero Benavides

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología SENESCYT y a la UTPL por el apoyo económico otorgado.

Con profundo respeto al Dr. Mariano Martínez Vázquez por los conocimientos transmitidos y por permitirme trabajar a su lado todos estos años.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho por los conocimientos transmitidos y su ayuda en la realización de las pruebas biológicas.

A Rocío Patiño, Héctor Ríos, Luis Velasco, Nieves Zabala, y Ángeles Peña por la asesoría técnica recibida para la elaboración de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Alejandro Zentella Dehesa y Dr. Jorge Meléndez Zajla por sus constantes aportaciones.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres.

A Natalia por ser mi apoyo en los momentos más difíciles y por enseñarme que el amor lo puede todo.

A mis hijos Carolina y José Emilio que son la razón de mi vida.

# INDICE

INDICE	v
INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
LINEAS CELULARES CITADAS EN EL TEXTO	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
2.1. INFLAMACIÓN	9
2.2. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN	10
2.3. RELACIÓN ENTRE EL CÁNCER Y LOS PROCESOS DE INFLAMACIÓN	14
2.4. LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) COMO DIANA MOLECULAR PARA LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER	17
2.4.1. AGENTES NATURALES ANTI-INFLAMATORIOS INHIBIDORES DE COX-2 CON POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO O ANTITUMORAL	19
2.5. CICLO CELULAR	22
2.5.1. CICLO CELULAR Y CÁNCER	27
2.6. BIOMARCADORES DEL CICLO CELULAR	29
2.6.1. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	30
2.7. PRODUCTOS NATURALES COMO AGENTES ANTITUMORALES INHIBIDORES DEL CICLO CELULAR	31
2.7.1. FÁRMACOS CUYO BLANCO MOLECULAR SON LOS MICROTUBULOS	32
2.7.2. PROTEÍNAS ANTI-MOTORAS	35
2.7.3. ANTI-QUINASAS QUINASAS	36
2.8. TRITERPENOS INHIBIDORES DEL CICLO CELULAR	39
2.9. PARTHENIUM ARGENTATUM	43
2.10. LA RESINA	46
<b>3. HIPOTESIS</b>	<b>48</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL	49
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	49
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>50</b>
5.1. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS GENERALES	50
5.2. RESINA	51
5.3. AISLAMIENTO DE LAS ARGENTATINAS A, B Y D:	51
5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA PRODUCIDA POR LAS ARGENTATINAS A, B, D Y SUS DERIVADOS	51
5.4.1. MODELOS DE INFLAMACIÓN IN VIVO	51
5.4.1.1. Animales de laboratorio	51
5.4.1.2. Inflamación inducida por 13-acetato de 12 O tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón	52
5.4.2. MODELOS "IN VITRO"	54
5.4.2.1. Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)	54

5.4.2.2.	Producción del óxido nítrico en macrófagos de ratón	54
5.4.2.2.1.	Obtención de macrófagos peritoneales de ratón	54
5.4.2.2.2.	Determinación de concentración de óxido nítrico (ON)	55
<b>5.5.</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CITOSTÁTICA PRODUCIDA POR LA ARGENTATINA B Y SUS DERIVADOS</b>	<b>56</b>
5.5.1.	CULTIVO CELULAR	56
5.5.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO	56
5.5.3.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD FLUOROMÉTRICO	57
5.5.3.1.	Ensayo de exclusion de Azul tripán y Observación de cambios morfológicos celulares	58
5.5.3.2.	Índice Mitótico y de replicación	58
5.5.3.3.	Análisis del ciclo celular	59
5.5.3.4.	Análisis estadístico	60
<b>5.6.</b>	<b>ESTUDIOS IN SILICO</b>	<b>61</b>
<b>5.7.</b>	<b>TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LAS ARGENTATINAS A Y B</b>	<b>61</b>
5.7.1.	ARGENTATINA A	62
5.7.1.1.	16,25-diacetil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxicicloartan-3 ona [1a]	62
5.7.1.2.	2 $\alpha$ -Bromo-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxi-16,2 dihidroxicicloartan- 3-ona [1b]	63
5.7.1.3.	3-oxima-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1c]	64
5.7.1.4.	4-Aza-20,24-epoxy-16, 25-dihydroxy-cycloartan [1d]	65
5.7.1.5.	20, 24-epoxi-3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cicloartan [1e]	66
5.7.1.6.	3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-20, 24-lactona [1f]	67
5.7.1.7.	3- hidroxil (16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1g]	68
5.7.1.8.	3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cycloart-17-en-24-oic acido [1h]	68
5.7.2.	ARGENTATINA B	69
5.7.2.1.	25-O-acetil-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a]	69
5.7.2.2.	2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2b]	70
5.7.2.3.	3-oxima-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2c]	72
5.7.2.4.	4-Aza-(16 $\beta$ ,24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d]	73
5.7.2.5.	(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3,4-lactona [2e]	74
5.7.2.6.	25-O-acetil-3-oxima-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan [2f]	75
5.7.2.7.	(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona [2g]	76
5.7.2.8.	(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> )-3-oxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-16,24 lactona [2h]	78
5.7.2.9.	(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> )-25- <i>nor</i> -cicloartan-3,24 dilactona [2i]	79
5.7.2.10.	1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxietil)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3 carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a] ciclopropa [e]-naftalen-6-ol [2j]	80
5.7.2.11.	1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxietil)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H ciclopenta [a] ciclopropa [e] -naftalen-6-ol [2k]	81
5.7.2.12.	2-formil-(16 $\beta$ ,24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2l]	82
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>116</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>127</b>

ROMERO, J. C., MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, A., HERRERA, M. P., MARTINEZ-MAYORGA, K., PARRA-DELGADO, H., PÉREZ-FLORES, F. J., & MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. (2014). SYNTHESIS, ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND MODELING STUDIES OF CYCLOARTANE-TYPE TERPENES DERIVATIVES ISOLATED FROM





## INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	La inflamación como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer.	16
2	Ciclinas que regulan la actividad de las CDKs	26
3	Triterpenos con efectos sobre el ciclo celular en células tumorales	41
4	Actividad Antiinflamatoria de las argentatinas A (1), B (2) y D (3)	85
5	Producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón inducida por 1 y 2	86
6	Actividad Antiinflamatoria de los derivados de la argentatina A (1) 1a-1h	94
7	Actividad Antiinflamatoria de los derivados de la Argentatina B (2) 2a-2e	94
8	Inhibición de COX-2 por la argentatina B (2) y los derivados 1h y 2b	95
9	Valores de $Cl_{50}$ para 2 y los derivados 2a-aI medida por FCMA	109
10	Valores de inducción de arresto del ciclo celular de 2 y sus derivados 2a-2I en células RKO expuestas por 24 horas a la $Cl_{50}$	110

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Esquema de los principales mediadores de la Inflamación y su papel biológico	11
2	Inhibidores de COX-2	13
3	Vías de señalización de la asociación de cáncer e inflamación	15
4	Agentes naturales anti-inflamatorios inhibidores de COX-2 con potencial quimiopreventivo o antitumoral	22
5	Representación gráfica del contenido de ADN en el ciclo celular	31
6	Medicamentos con blanco molecular los microtubulos	34
7	Medicamentos inhibidores de proteínas antimotoras	36
8	Medicamentos antiquinasas quinasas	38
9	Triterpenos Inhibidores del ciclo celular	40
10	Arbusto de <i>Parthenium argentatum</i>	43
11	Estructuras de las guayulinas aisladas de <i>P. argentatum</i>	45
12	Estructura de los triterpenos aislados de <i>P. argentatum</i>	46
13	Obtención de la 16, 25-diacetil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxicicloart-3-ona [ <b>1a</b> ]	61
14	Obtención de la 2 $\alpha$ -Bromo-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [ <b>1b</b> ]	63
15	Obtención de la 3-oxima-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxi-16,25- dihidroxicicloartan [ <b>1c</b> ]	64
16	Obtención de la 4-Aza-20, 24-epoxy-16, 25-dihydroxy-cycloartan [ <b>1d</b> ]	65
17	Obtención de la 20, 24-epoxi-3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cicloartan [ <b>1e</b> ]	66
18	Obtención de la 3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-20,24-lactona [ <b>1f</b> ]	67
19	Obtención de la 3-hidroxi (16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [ <b>1g</b> ].	68
20	Obtención de la 3,16-Dioxo-25- <i>nor</i> -cycloart-17-en-24-oic acido [ <b>1h</b> ]	68
21	Obtención de 25-O-acetil-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [ <b>2a</b> ]	69
22	Obtención de la 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [ <b>2b</b> ]	70
23	Obtención de la 3-oxima-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [ <b>2c</b> ]	72
24	Obtención de la 4-aza- (16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [ <b>2d</b> ]	73
25	Obtención de la (16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3,4-lactona [ <b>2e</b> ]	74
26	Obtención la 25-O-acetil-3-oxima-(16 $\beta$ , 24 <i>R</i> )-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan [ <b>2f</b> ]	75

27	Obtención de la (16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona [ <b>2g</b> ]	76
28	Obtención de la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona [ <b>2h</b> ]	78
29	Obtención de la (16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona [ <b>2i</b> ]	79
30	Obtención de la 1a-(2-metoxicarboniletil)-2-(1-metil-1-hidroxietil)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-metoxicarbonilpropil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a]ciclopropa[e]-naftalen-6-ol [ <b>2j</b> ]	80
31	Obtención de la 1a-(2-carboxiletil)-2-(1-metil-1-hidroxietil)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a]ciclopropa[e]-naftalen-6-ol [ <b>2k</b> ]	81
32	Obtención de la 2-formil-(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [ <b>2l</b> ]	82
33	Derivados de la argentatina A ( <b>1</b> ) <b>1a-1h</b> . Condiciones de reacción y rendimiento	87
34	Derivados de la argentatina B ( <b>2</b> ) <b>2a-2e</b> . Condiciones de reacción y rendimiento	91
35	Modo de enlace de la argentatina B ( <b>2</b> ) dentro del sitio activo de COX-2, obtenida del ajuste de inducido "docking".	97
36	Comparación de la argentatina B ( <b>2</b> ) (negro) y el compuesto <b>2c</b> . conformaciones y orientaciones relativas que se obtuvieron del ajuste inducido de acoplamiento "docking"	98
37	Modos de unión propuestos y mapas de interacción 2D de la Argentatina A ( <b>1</b> ), en el sitio activo de la COX-2	99
38	Células RKO tratadas con Argentatina B ( <b>2</b> ). <b>A</b> ) Supervivencia celular evaluada por el ensayo de FCMA. <b>B</b> ) Viabilidad evaluada por el ensayo TBE	101
39	Efecto de la Argentatina B ( <b>2</b> ) en los cambios morfológicos de células RKO. Las células se trataron con A) EtOH 0,1%, B) 15, C) 30, D) 45, E) y F 60) 75 $\mu$ M de <b>2</b> durante 24 h	102
40	Células RKO tratadas con Argentatina B. <b>A</b> ) Índice mitótico (IM) <b>B</b> ) Índice de replicación (IR)	103
41	Análisis del ciclo celular. Células RKO expuestas a 15, 25, 35 y 45 $\mu$ M de <b>2</b> durante 24 h <b>A</b> ) y 48h. <b>C</b> ). Histogramas representativos de cada concentración de <b>2</b> durante 24 h <b>B</b> ) y <b>D</b> 48h	105
42	Derivados de la argentatina B ( <b>2</b> ) <b>2f-2l</b> . Condiciones de reacción y rendimiento	106
43	Efecto en el ciclo celular de la Cl <sub>50</sub> de los derivados de la argentatina B ( <b>2</b> ) <b>2a-2l</b> sobre células RKO expuestas durante 24 h	111
44	Cambios morfológicos de las células RKO después del tratamiento con los derivados mas citostáticos de <b>2</b> . Las células fueron tratadas A) Etanol 0,1% and Cl <sub>50</sub> de los derivados B) <b>2b</b> , C) <b>2f</b> y D) <b>2c</b>	112

## ABREVIATURAS

---

AA	Ácido Araquidónico
AP-1	Proteína activadora 1
AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
CCF	Cromatografía en capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50%
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50%
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
FMAC	Ensayo fluorométrico de micro cultivo
IL-1	Interleucina-1
<i>i</i> -NOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IP	Yoduro de propidio
IR	Espectroscopia infrarrojo
LOX	Lipooxigenasa
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrienos
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MeOH	Metanol
MDM2	Mouse doble minute homologue 2
NO	Oxido Nítrico
NF-κB	Factor nuclear de transcripción kappa de las células B
PG	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKC	Proteína cinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMA	Forbol 13-acetato-12-miristrato
p53	Gen p53 o tp53, también llamado el "guardián del genoma"
pRB	Proteína del retinoblastoma
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TBE	Método de exclusión del colorante de azul de tripano
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoil forbol

## LINEAS CELULARES CITADAS EN EL TEXTO

---

A549	Adenocarcinoma de pulmón humano
B16F10	Melanoma de piel de ratón
Ca Ski	Carcinoma epidermoide de cuello uterino humano
CEM/VLB	Leucemia humana resistente
HCT15	Adenocarcinoma colorectal humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HT-29	Adenocarcinoma colorectal humano
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de glándula mamaria humana
MG-63	Osteosarcoma humano
ML-1a	Leucemia mieloide monoblástica
R-HepG2	Células resistentes a los medicamentos de carcinoma hepatocelular
RKO	Carcinoma de colon humano
SAOS-2	Osteosarcoma humano
SW620/Ad-300	Carcinoma de colon humano resistente a la doxorrubicina
U937	Linfoma histolítico humano
4T1	Cáncer de mama en etapa IV

## Resumen

Las actividades antiinflamatorias de las argentatinas A (**1**), B (**2**) y D (**3**), los principales triterpenos presentes en *Parthenium argentatum*, fueron evaluadas mediante el modelo *in vivo* de edema inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en ratones. Nuestros resultados indicaron que **2** ( $ED_{50} = 1,5 \times 10^{-4}$  mmol/oreja) y **1** ( $ED_{50} = 2,8 \times 10^{-4}$  mmol/oreja) mostraron mayor actividad antiinflamatoria que la indometacina ( $ED_{50} = 4,5 \times 10^{-4}$  mmol/oreja), el fármaco de referencia. Basados en estos resultados, se decidió evaluar 13 derivados de las argentatinas A y B. Todos los derivados mostraron actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA en ratones. El compuesto más activo fue el ácido 25-norcicloart-3, 16-diona-17-en-24 oico (**1h**), obtenido a partir de **1** ( $ED_{50} = 1,4 \times 10^{-4}$  mmol / oreja). Adicionalmente, la Argentatina B (**2**) se evaluó como inhibidor de la actividad de la enzima COX-2 la cual es clave en el ensayo en el desarrollo de la inflamación por vía del ácido araquidónico. Los resultados mostraron que **2** a 30  $\mu$ M inhibió 77% de actividad de COX-2. Estudios de acoplamiento teóricos (*in silico*) sugieren que **2** interactúa con Arg 120 de la COX-2, un residuo clave para la actividad de ésta enzima.

Por otro lado, también se evaluó la actividad citotóxica de **2**, sobre la línea celular de cáncer colorrectal humana RKO, mediante el ensayo fluorométrico de micro cultivo (FMAC) y el ensayo de exclusión con azul de tripano (TBE). Así mismo se tomaron microfotografías del cambio morfológico de las células RKO tratadas con **2**. Los resultados del ensayo FMAC mostraron que **2** indujo muerte celular y causó una disminución del índice mitótico así mismo las microfotografías de los diferentes tratamientos mostraron inducción de

apoptosis mediado por la administración de **2**. No obstante lo anterior los resultados del ensayo de TBE demostraron que la argentatina B sólo indujo un ligero efecto en la integridad de la membrana celular. También se evidencio una ligera disminución en la tasa de replicación, en células RKO, inducida por **2**.

Con el fin de obtener mayor información con respecto al mecanismo por el cual puede actuar la argentatina B (**2**), se decidió evaluar la actividad de éste triterpeno sobre el ciclo celular. Nuestros resultados demostraron que **2** induce detención del ciclo celular en la fase G0/G1

Todos estos datos sugieren que **2** inicialmente induce un efecto citostático el cual al no ser resuelto, en un tiempo dado, dará a lugar a un efecto citotóxico posiblemente mediado por apoptosis.

Con el fin de establecer relaciones de estructura-actividad se evaluaron 10 derivados de **2** tanto en el ensayo FMAC así como sus efectos sobre el ciclo celular, los compuestos más activos fueron **2c** y **2f**, estos resultados indicaron que no existe una relación entre los compuestos más activos en el ensayo de FMAC y aquellos con mayor actividad sobre el ciclo celular.



## Abstract

The anti-inflammatory activities of argentatins A (**1**), B (**2**) and D (**3**), the main triterpenes present in *Parthenium argentatum*, were evaluated *in vivo* using a mouse 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced edema model. Our results indicated that **2** ( $ED_{50} = 1.5 \times 10^{-4}$  mmol/ear) and **1** ( $ED_{50} = 2.8 \times 10^{-4}$  mmol/ear) showed greater anti-inflammatory activity than indomethacin ( $ED_{50} = 4.5 \times 10^{-4}$  mmol/ear), the reference drug. Based on these findings, we decided to evaluate 13 derivatives of argentatins A and B. All of these derivatives showed anti-inflammatory activity in the mouse TPA-induced edema model. The most active compound was 25-nor-cycloart-3, 16-dione-17-en-24-oic acid, obtained from **1** ( $ED_{50} = 1.4 \times 10^{-4}$  mmol/ear). Additionally, **2** was evaluated as inhibitor of COX-2 activity one of the key enzymes involved in the TPA assay. The results showed that **2** at 30  $\mu$ M doses inhibited 77% of COX-2 activity. Theoretical docking studies (*in silico*) suggest that **2** interacts with Arg 120, a key residue for COX-2 activity.

Furthermore, the potential cytotoxic activity of Argentatin B (**2**) was evaluated using the RKO human colorectal cancer cell line by both the fluorometric micro-culture cytotoxicity (FMAC) and trypan blue exclusion (TBE) assays. The FMAC test results showed that **2** induces cell death and caused a decrease in mitotic index, likewise, the photomicrographs of different treatments showed induction of apoptosis mediated by administration **2**. However, the TBE test showed that **2** induced only a slight effect on the integrity of the cell membrane and slight decrease in the replication rate of RKO cells.

To obtain more information about the mechanism by which **2** acts, we evaluated triterpene activity on the cell cycle. Our results showed that **2** induces cell cycle arrest in G0/G1.

Taken together, our data suggest that **2** initially induces a cytostatic effect, which (if not resolved within a given time) will give rise to a cytotoxic effect possibly mediated by apoptosis.

Furthermore, to establish the structure-activity relationships, we evaluated 10 derivatives from **2** by both FMAC assay and as arrest cell cycle agents. The most active derivatives were **2c** and **2f**. We found no relationship between the most active compounds (as determined by FMAC) and those with increased activity on the cell cycle.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, ya que provocó 8,2 millones de muertes en 2012 (Ferlay et al., 2013). Los cánceres más comunes incluyen pulmón, mama, próstata y colorrectal (Stewart and Wild, 2014). A pesar de que hoy en día hay varios fármacos antitumorales, sin embargo, la inmensa mayoría causan una relevante toxicidad. Adicionalmente se conoce de que a la larga las células tumorales pueden desarrollar resistencia a éstos medicamentos (Zhou et al., 2009).

Durante las últimas dos décadas, una gran cantidad de información señala a la respuesta inflamatoria crónica como la causa de la mayoría de las enfermedades degenerativas, incluyendo diferentes tipos de cáncer (Moore et al., 2010; Balkwill and Mantovani, 2012). La identificación de factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, AP-1 y STAT3 y sus productos génicos como el factor de necrosis tumoral, las interleucinas -1, -6, algunas quimiocinas, la ciclooxigenasa-2, la lipooxigenasa-5, las metaloproteasas de matriz, y el factor de crecimiento vascular endotelial, moléculas de adhesión y otros han proporcionado la base molecular para el papel de la inflamación en cáncer (Balkwill and Mantovani, 2012). Estas vías han sido implicadas en la transformación, supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis, metástasis, quimio-resistencia, y radio-resistencia del cáncer. Tomando en cuenta lo anterior se ha postulado que la supervivencia y la proliferación de la mayoría de tipos de células de cáncer parecen ser dependiente de la activación de estas vías (Coussens et al., 2013).

Por lo tanto la necesidad del descubrimiento y desarrollo de nuevos productos farmacéuticos para el tratamiento de cáncer exige que sean explotados todos los enfoques. Entre ellos destaca el de productos naturales ya que ha hecho numerosas contribuciones únicas y vitales en el descubrimiento de nuevos fármacos (Cragg and Newman, 2013a). Los metabolitos secundarios de especies vegetales tienen una larga historia como agentes anti cancerosos. Por ejemplo, varios de los fármacos citotóxicos utilizados actualmente en la clínica son obtenidos de especies vegetales (Cragg and Newman, 2009). Algunos de ellos también han sido investigados como agentes antiinflamatorios, por ejemplo, se ha informado de las propiedades anti edematosas, mediante una inhibición significativa de la producción de óxido nítrico (ON), de varios glucósidos de tipo cicloartano aislados de *Astragalus membranaceus* (Lee et al., 2013). Otro ejemplo son los terpenoides aislados de *Krameria pauciflora*, estos compuestos inhiben selectivamente las ciclooxigenasas 1 (COX-1) y 2 (COX-2) (Grivennikov et al., 2010). Por lo tanto, con el fin de lograr una mayor relevancia terapéutica es deseable que un fármaco anticanceroso también fuese antiinflamatorio. (Grivennikov et al., 2010; Balkwill and Mantovani, 2012a).

Se conoce que los glicósidos triterpénicos son importantes componentes estructurales de las membranas vegetales. Por otro lado, los triterpenos libres estabilizan las bicapas de fosfolípidos en las membranas celulares de plantas, de manera similar que el colesterol hace en las membranas de células animales (Dzubak et al., 2006). Los triterpenos tienen una gran distribución en

el reino vegetal y poseen un amplio espectro de actividades biológicas (Dzubak et al., 2006; Sandjo et al., 2011; Pudhom et al., 2012; Prawat et al., 2013).

El *Parthenium argentatum* Gray es un arbusto común del desierto que crece en el norte de México y el suroeste de EE.UU., esta especie ha sido utilizada como una importante fuente de hule natural (Rodriguez-Hahn et al., 1970; Komoroski et al., 1986). Nuestros estudios así como los de otros autores han indicado que los triterpenos de tipo cicloartano llamados argentatinas A (**1**) y B (**2**) son los principales constituyentes de la "resina" el principal subproducto de la producción de caucho (Martínez et al., 1990). Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron el potencial citotóxico, y antiproliferativo, contra varias líneas celulares de cáncer humano, de las argentatinas A (**1**), B (**2**) y D (**3**) así como algunos de sus derivados (Parra-Delgado et al., 2005, 2006). Utilizando la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis se demostró que **1** y **2** no mostraron efecto genotóxico en linfocitos en proliferación. También se demostró que **2** no es capaz de causar lesiones en el ADN por mecanismos clastogénicos o aneugénicos (Parra-Delgado et al., 2005, 2006). Tomando en cuenta lo anterior se decidió evaluar las actividades antiinflamatorias de **1-3**, así como de 13 derivados de **1** y **2** en el modelo de edema inducido por TPA en ratones. Adicionalmente se realizaron estudios de acoplamiento *in silico* (Docking) entre **2** y la COX-2. También se determinó la producción de ON en macrófagos peritoneales de ratón.

Como se mencionó anteriormente el cáncer colorrectal es uno de los cuatro cánceres más recurrentes sobre el mundo y sabiendo que **2** está disponible en

gran cantidad decidimos evaluar la citotoxicidad de éste triterpeno en la línea celular de cáncer colorrectal humano RKO tanto por el ensayo de microcultivo fluorométrico (FMAC) como por el ensayo de exclusión con azul tripano (TBE). Adicionalmente se analizó, mediante citometría de flujo, la capacidad de inhibición del ciclo celular de **2** y de 10 de sus derivados.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. INFLAMACIÓN**

La inflamación es la respuesta fisiológica normal a la lesión tisular y esta mediada por un sistema complejo de interacciones entre los factores solubles llamadas quimosinas, las cuales regulan la migración direccional de leucocitos durante estados de la inflamación, que puede presentarse en cualquier tejido en respuesta a la lesión traumática, infecciosa, tóxica o autoinmune. El proceso conduce normalmente a la recuperación de la infección y a su curación, sin embargo, si la destrucción y la reparación no se efectúan de manera correcta, la inflamación puede conducir al daño persistente del tejido mediado por los leucocitos (Nathan, 2002). Las características vivibles de la inflamación, consisten en la presencia de dolor, aumento de temperatura, hinchazón y enrojecimiento, (en ocasiones la pérdida de la función). Estos signos (calor, rubor y dolor) de manera general constituyen los efectos palpables de cualquier proceso inflamatorio (Gijón and Leslie, 1997). La inflamación inducirá un aumento del flujo sanguíneo, así como una mayor permeabilidad vascular y promoverá la migración de glóbulos blancos (granulocitos, monocitos y linfocitos) a los sitios dañados. También inducirán una producción concomitante de mediadores solubles tales como proteínas de fase aguda, eicosanoides y citocinas. Las células pro-inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares) son estimuladas para inducir y activar enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno generadas por varios factores, incluyendo partículas fagocitadas insolubles, complejos inmunes, una variedad de agentes

quimiotácticos pro-inflamatorios. Las enzimas generadores de oxidantes producen altas concentraciones de diversos radicales y oxidantes principalmente para combatir y neutralizar los patógenos invasores y cuerpos extraños así como para destruir los tejidos del huésped infectados.

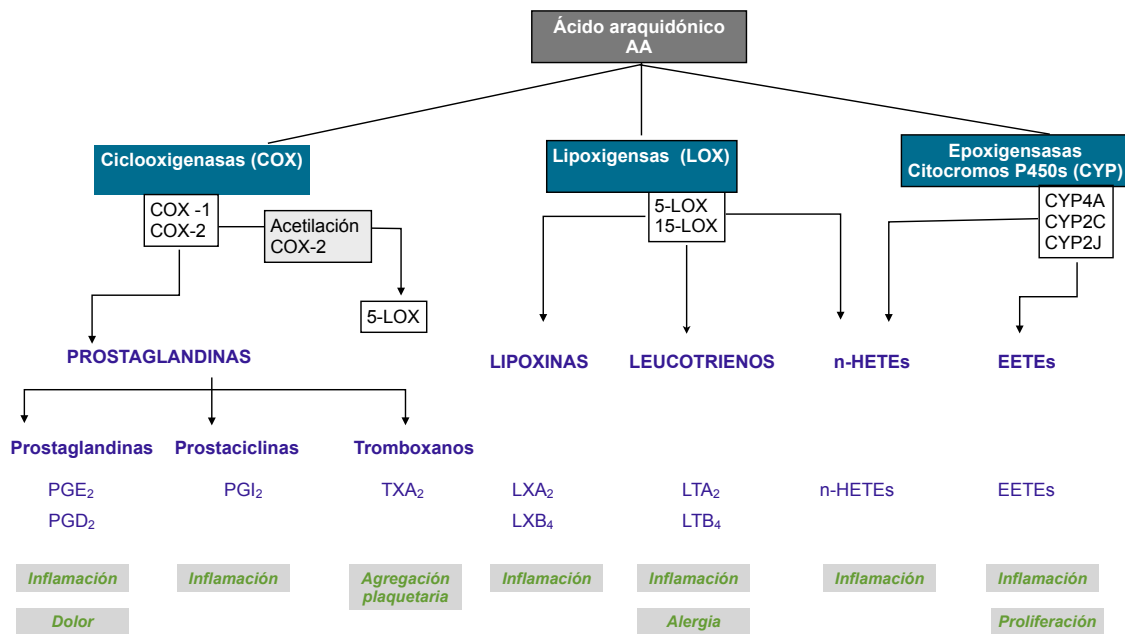
La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La inflamación aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos polimorfonucleares (LPMN), predominantemente de neutrófilos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (Muller, 2002).

## **2.2. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN**

Los eicosanoides son productos oxigenados de 20 átomos de carbono que derivan del ácido (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetranóico (ácido araquidónico, AA), entre los que podemos destacar las prostaglandinas, leucotrienos y entes. Los eicosanoides son potentes mediadores de la inflamación y aunque son localizados de manera específica, ésta depende del tipo de célula (Figura 1). Estos mediadores lipídicos juegan un papel crítico en diversos procesos fisiológicos y anatomopatológicos, como la fibrosis pulmonar y cáncer. Las familias de enzimas de las ciclooxigenasas (COX) así como de las lipoxigenasas (LOX) son responsables del metabolismo de ácido



araquidónico; este metabolismo conduce a la producción de prostaglandinas y leucotrienos, respectivamente como se indica en la Figura 1.



**Figura 1.** Esquema de los principales mediadores de la Inflamación y su papel biológico. El ácido araquidónico es metabolizado por los sistemas enzimáticos iniciados por las ciclooxygenasas (COX 1 y 2), lipoxigenasas (5-LOX y 15-LOX), y el citocromo (CYP) P450s. Modificado de (Greene et al., 2011).

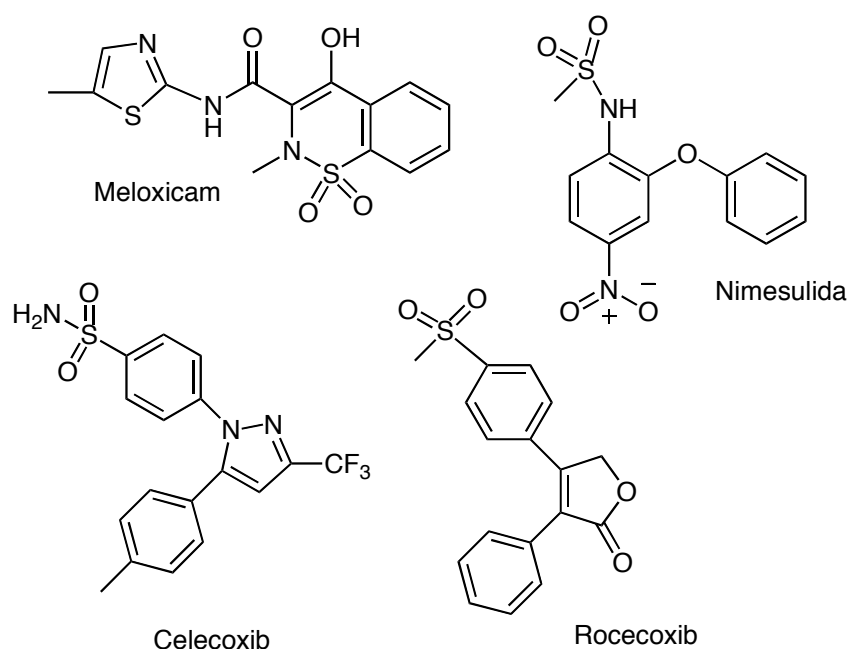
Existen dos isoformas de ciclooxygenasa la llamada COX-1 y la COX-2, que han sido reconocidas desde 1991. La COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, y desempeña un papel central en la agregación plaquetaria y la protección cito gástrica. Aunque la COX-2 se expresa constitutivamente en el riñón y en el cerebro humano, se expresa en el resto de tejidos únicamente en respuesta a ciertos estímulos tales como mitógenos, citoquinas, factores de crecimiento u hormonas. La COX-1 y la COX-2 inician la formación de prostanoides importantes, que biológicamente coordinan la señalización entre la célula de origen (autocrina) y las células vecinas (paracrinas) mediante la

unión a receptores transmembrana acoplados a la proteína G, de ésta manera, media los procesos inflamatorios (Tsao et al., 2004).

Actualmente se conoce que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) compiten con el ácido araquidónico, el cual es liberado en la respuesta inflamatoria, para acoplarse al sitio activo en los canales enzimáticos (Greene et al., 2011). Se ha postulado que este tipo de fármacos bloquean las actividades de COX al establecer enlaces de hidrógeno a la arginina polar en posición 120. Para que un AINE sea selectivo, es crítica la presencia de un aminoácido clave en la posición 530 de estas enzimas, concretamente la isoleucina para COX-1 y la valina para COX-2, que deja una abertura en la pared del canal que permite el acceso a un lugar de acoplamiento (Cryer and Feldman, 1998; Hawkey, 1999; Feldman and McMahon, 2000).

En 1990 aparecieron los primeros inhibidores de la COX-2: la nimesulina y el meloxicam, ambos fármacos mostraron ser mejores inhibidores de la COX-2 que de la COX-1. El meloxicam (Movalis®, Parocin®, Uticox®) es una enolcarboxamina relacionada con el piroxicam, y se estima que tiene una selectividad entre 3 y 77 veces mayor para COX-2. No obstante, ésta selectividad para COX-2, disminuye al aumentar la dosis del fármaco. La nimesulida (Antifloxil®, Guaxan®, Severin F®) pertenece a la familia de las sulfonanilidas y presenta una selectividad entre 5 y 16 veces mayor para COX-2 y al igual que en el caso del meloxicam, a partir de dosis más elevadas pierde la selectividad para la COX-2. El celecoxib es un compuesto derivado del 1,5-diarilpirazol con una selectividad 375 veces mayor para la COX-2 mientras que

el rofecoxib es un derivado metilfenilsulfonil que presenta una relación COX-2/COX-1 superior a 800 (Méric et al., 2006; Ulrich et al., 2006). En la figura 2 se muestran las estructuras de estos fármacos.



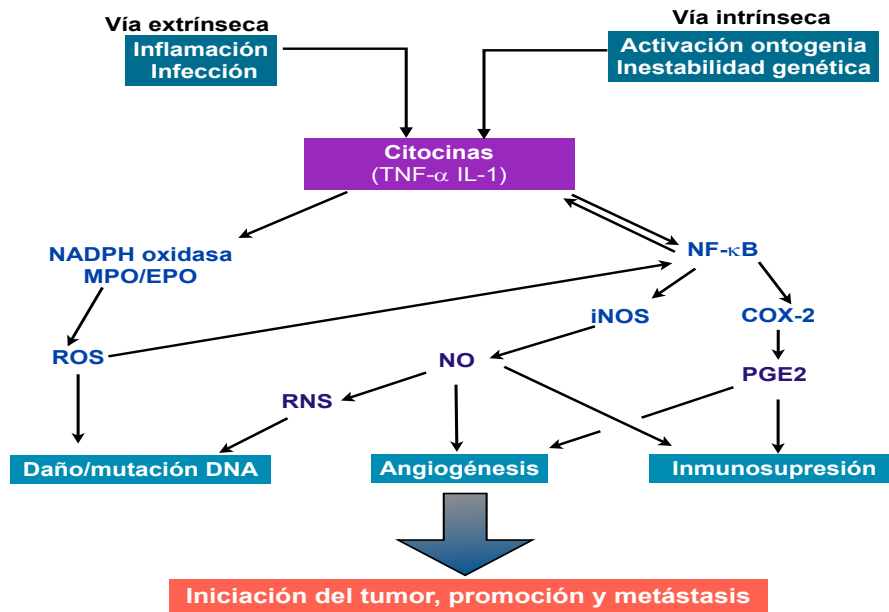
**Figura 2.** Inhibidores de COX-2

Entre los inhibidores de la COX-2 que se han empleado en la clínica para el tratamiento del cáncer están los AINE. Numerosos ensayos han demostrado que la inhibición de la COX con medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos puede prevenir y tratar los pólipos colorrectales en diferentes entornos. Tanto el sulindaco como el celcoxib reducen el número de pólipos en pacientes con poliposis adenomatosa de tipo familiar gen (William et al., 2009).

### **2.3. RELACIÓN ENTRE EL CÁNCER Y LOS PROCESOS DE INFLAMACIÓN**

La inflamación y la infección crónica se asocian con la tumorigénesis en uno de cada cinco pacientes con cáncer en el mundo (Tanaka et al., 2005; Cuzick et al., 2009; Grivennikov et al., 2010; Moore et al., 2010b; Balkwill and Mantovani, 2012b). La relación funcional entre la inflamación y cáncer no es nueva; en 1863 Virchow propuso que el origen del cáncer estaba en sitios de inflamación crónica, su hipótesis, en parte se basó en que algunas clases de irritantes, junto con una lesión de tejido y el proceso de inflamación que sobreviene, aumentan la proliferación celular (Tanaka et al., 2005; Cuzick et al., 2009; Grivennikov et al., 2010; Moore et al., 2010b; Balkwill and Mantovani, 2012b).

En la actualidad, es claro que el microambiente de los tumores está dirigido en gran parte por células inflamatorias y es indispensable en el proceso neoplásico, fomentando la proliferación, la sobrevivencia y la migración (Brennecke et al., 2015) (Figura 3).



**Figura 3.** Vías de señalización de la asociación de cáncer e inflamación  
Tomada de (Ohshima et al., 2005)

Adicionalmente, las células tumorales han copiado algunas de las señales moleculares del sistema inmune innato, como son las quimosinas, la invasión por receptores, la migración y la metástasis.

El proceso inflamatorio y cáncer están conectados por dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca es activada por eventos genéticos que causa neoplasia, incluyendo activación de oncogenes, inestabilidad cromosómica, y la inactivación de genes supresores de tumores. Por el contrario, en la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias o infecciosas aumentan el riesgo de desarrollar cáncer en ciertos sitios anatómicos. Las dos vías convergen, lo que resulta en la activación de factores de transcripción, principalmente factor nuclear kappa B (NF-κB), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y el factor inducible por hipoxia 1α (HIF1α), en células tumorales (Mantovani et al., 2008).

Muchos cánceres se presentan en sitios de infección, irritación crónica e inflamación. Las personas con enfermedades inflamatorias crónicas están en mayor riesgo de desarrollar cáncer del respectivo tejido inflamado, lo que indica que la inflamación es, al menos en parte, la causa y no un efecto de desarrollo del cáncer; algunos ejemplos de esta relación se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** La inflamación como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer.

Inductor	Inflamación	Cáncer	% de predisposición a progresión de cáncer
Humo de tabaco	Bronquitis	Cáncer de pulmón	11-24
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis	Cáncer gástrico	1-3
Virus de papiloma humano	Cervicitis	Cáncer cervical	<1
Tabaco y alcohol	Esofagitis	Cáncer de esófago	15
Fibras de asbesto	Asbestosis	Mesoteloma	10-15

Fuente: (Ohshima et al., 2005)

En las células tumorales y las células epiteliales en riesgo de transformación por agentes carcinógenos, así como en células con procesos inflamatorios, el NF- $\kappa$ B se activa. La expresión de éste factor de transcripción activa la expresión de genes que codifican citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, enzimas en la vía de la síntesis de prostaglandinas (tales como la COX-2), óxido nítrico (iNOS; también conocido como NOS<sub>2</sub>) y los factores angiogénicos. La exposición de las células a mitógenos, citocinas inflamatorias, UV, radiación ionizante, toxinas bacterianas, entre otros provoca una rápida fosforilación de I $\kappa$ B, y promueven o potencian regiones de COX-2 y otros genes, regulando de este modo su expresión (Ohshima et al., 2005).

El papel de la isoenzima ciclooxigenasa inducible COX-2 en la carcinogénesis puede incluir la modulación de la apoptosis y la inmunidad, la estimulación de la angiogénesis, y la promoción de la invasión tumoral. Recientemente se han reportado asociaciones entre los polimorfismos de la COX-2 y el riesgo de cáncer de colon y de pulmón (Ohshima et al., 2005)., la COX-2, se sobre expresa en lesiones precursoras de cáncer de mama (carcinoma ductal in situ), pulmón, colon y recto (pólipos adenomatosos). Por el contrario, los inhibidores selectivos COX-2 (por ejemplo, celecoxib) tienen un potencial quimiopreventivo.

#### **2.4. LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) COMO DIANA MOLECULAR PARA LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER**

La vinculación de los procesos inflamatorios con el cáncer tiene importantes implicaciones para la terapia del cáncer. Así las células inflamatorias y los mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral pueden ser objetivos para el tratamiento o la prevención, y los fármacos antiinflamatorios existentes pueden ser útiles en la prevención y tratamiento del cáncer (Balkwill and Mantovani, 2010). La mayoría de los cánceres progresan a través de la acción de múltiples vías que incluyen la COX-2, Wnt- $\beta$ -catenina, MAP cinasa, y del factor de crecimiento. Los fármacos que bloquean simultáneamente, de varias maneras, las rutas de proliferación podrían actuar como agentes quimiopreventivos, si los beneficios clínicos son mayores que los efectos tóxicos (Cuzick et al., 2009).

La COX-2 se sobre expresada en una variedad de cánceres humanos

incluyendo gástrico, de esófago, de páncreas, de mama y de colon, mientras que es indetectable en la mayoría de los tejidos normales. Además, la sobreexpresión de COX-2 fue suficiente para causar la tumorigénesis en modelos animales y para hacer a las células resistentes a los estímulos apoptóticos (Greenhough et al., 2009). La anulación del gen COX-2 en un modelo de ratón en el que se desarrolló una carcinogénesis intestinal resultó en una reducción sustancial en el número y tamaño de pólipos intestinales. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la inhibición de la actividad de COX-2, y por lo tanto la disminución resultante en la producción de prostaglandinas puede contribuir al efecto anticanceroso, bien documentado, de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Se ha demostrado que, inhibidores selectivos de la COX-2 modulan eventos tumorigénicos, angiogénicos y apoptóticos que producen una reducción de la incidencia y progresión del tumor (Masferrer et al., 2000). El inhibidor específico de COX-2, NS-398, por ejemplo, suprime el crecimiento de diferentes líneas celulares de tumores de cáncer e induce apoptosis en carcinomas humanos de colon, de próstata y en células de adenocarcinoma de esófago (Totzke et al., 2003). Otros inhibidores específicos de la COX-2 tales como celecoxib y nimesulida inducen apoptosis en cáncer de pulmón, en carcinoma de próstata, así como en las células de cáncer de colon, y de manera eficiente inhibe el crecimiento tumoral en modelos animales. Por lo tanto, la inhibición de COX-2 es considerado como un objetivo atractivo para el tratamiento del cáncer .



### **2.4.1. Agentes naturales anti-inflamatorios inhibidores de COX-2 con potencial quimiopreventivo o antitumoral**

Existen múltiples agentes de origen natural con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que actúan a través de la inhibición de COX-2 y que a la vez se ha demostrado su eficiencia como agentes quimiopreventivos, algunos de ellos se describen a continuación:

La aspirina es un derivado químico del ácido acetil salicílico obtenido de varias fuentes naturales incluyendo la especie *Salix alba*. Existe suficiente evidencia que apoya el hecho de que la aspirina presenta un efecto quimiopreventivo en el cáncer colonrectal y, probablemente, en otros tipos de cáncer. El mecanismo molecular de acción de la aspirina fue descubierto en la década de 1970 cuando se demostró que mediante una acetilación inactiva la enzima ciclooxigenasa de manera irreversible. La aspirina es el único fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que inactiva irreversiblemente ambas isoformas de las enzimas COX (COX-1 y COX-2), que dan lugar a sus propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y efectos analgésicos. También se ha demostrado experimentalmente, que la aspirina induce la apoptosis e inhibe la angiogénesis en las células cancerosas. La mayoría de las hipótesis se han centrado en la capacidad de la aspirina para afectar la COX-1 y COX-2. La aspirina y su metabolito principal, el salicilato afectan a la expresión de COX-2 en ambos niveles: transcripcionales y postranscripcionales. La inhibición de la enzima ciclooxigenasa aumenta los niveles del ácido araquidónico, lo que puede impulsar la conversión de esfingomielina a ceramida, que es un mediador conocido de la apoptosis. La aspirina es conocida por afectar la

función plaquetaria a través de la inhibición de la COX. Los pacientes con cáncer muestran un aumento en la activación de las plaquetas que ha sido conocida por tener un papel en la progresión del cáncer y la metástasis (Subbegowda and Frommel, 1998; Cuzick et al., 2009; Alfonso et al., 2014).

La curcumina, un pigmento amarillo presente en el rizoma de la cúrcuma (*C. longa* Linn) y especies afines, tiene una amplia gama de actividades farmacológicas y biológicas. Los efectos antioxidante y antiinflamatorios de este compuesto han sido evaluados en varios sistemas experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. La curcumina inhibe el crecimiento de células tumorales e induce apoptosis en células de melanoma (Anto, Mukhopadhyay, Denning, & Aggarwal, 2002; Anto, Mukhopadhyay, Denning, Aggarwal, et al., 2002; Khaw, Hande, Kalthur, & Hande, 2012). Además la curcumina presenta efecto citostático en células del músculo liso vascular, induce detención del ciclo celular ~~inducido por~~ mediante la estabilización de p53 debido a la inhibición de MDM2 por incremento de p21 (Lewinska et al., 2015). La aplicación tópica de curcumina inhibió fuertemente la inflamación inducida por TPA, la hiperplasia, la proliferación, la actividad de la ODC, la generación de ROS, la modificación de bases de ADN oxidado y la formación de papiloma en la piel del ratón. La curcumina inhibe las actividades de la COX-2 y las lipoxigenasas en epidermis de ratones tratados con TPA (Surh, 2002). El tratamiento de varias líneas de células gastrointestinales humanas con la curcumina suprime la expresión de COX-2 a nivel de mRNA y de proteínas, la producción de la prostaglandina E2, inducidas por TPA. Además la curcumina también afecta a la translocación nuclear de NF-κB. Del mismo modo, la activación de NF-κB en cultivos de la

línea humana de células de leucemia mieloide monoblástica estimuladas con TPA, TNF- $\alpha$  o peróxido de hidrógeno se suprimió mediante el tratamiento de curcumina (Lin et al., 2010).

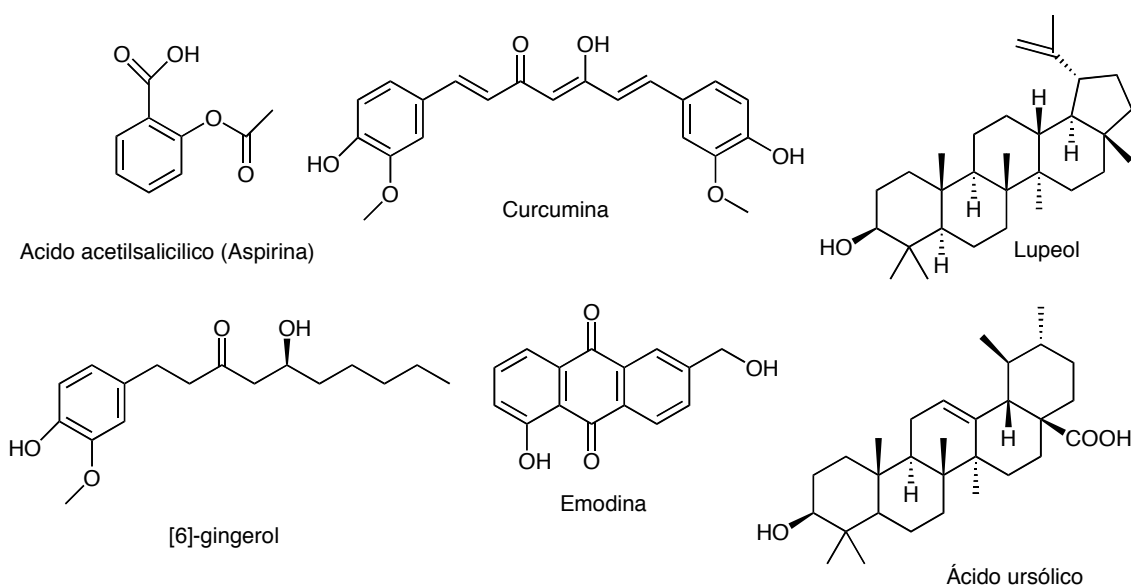
El (6)-gingerol obtenido de las raíces del *Zingiber officinale*, (Zingiberaceae), exhibe diversas actividades farmacológicas, como la inhibición de la COX y de las lipoxigenasas (Taraphdar et al., 2001). Cuando se aplica tópicamente antes de cada tratamiento con TPA y después de la iniciación con 7,12-dimetilbenz [a] antraceno, el gingerol inhibe la formación de tumores en la piel de los ratones (Surh, 2002).

La emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona) es un componente antipirético y anti-inflamatorio aislado de la raíz de *Rheum palmatum* y de *Polygonum cuspidatum*, entre otras especies. La emodina mostró citotoxicidad significativa que se asoció con especies reactivas de oxígeno mediada por estrés del retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial (Srinivas et al., 2003; Wang et al., 2007; Yu et al., 2008; Bhanot et al., 2011).

El ácido ursólico, un triterpeno pentacíclico que se encuentra en el romero o muchas otras especies medicinales, posee efectos anticancerígenos y anti-inflamatorios (Dzubak et al., 2006). Inhibe la inflamación y la promoción tumoral inducida por PMA en la piel del ratón. Estos efectos se han atribuido, en parte, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, debido a que suprime la expresión génica de la COX-2 (Subbaramaiah et al., 2000). Otro triterpenoide pentacíclico, es el lupeol que es un constituyente principal de muchas frutas y

vegetales comunes, por ejemplo, aceitunas, mangos e higos, y en varias hierbas medicinales.

El lupeol tiene efectos terapéuticos en algunos tipos de cáncer y en la inflamación. Varios estudios han demostrado que el lupeol inhibe la señalización NF- $\kappa$ B, incluyendo la fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , complejo de unión al ADN de NF- $\kappa$ B (Salminen et al., 2008).



**Figura 4.** Agentes naturales anti-inflamatorios inhibidores de COX-2 con potencial quimiopreventivo o antitumoral

## 2.5. CICLO CELULAR

El ciclo celular se define como una serie ordenada de acontecimientos macro-moduladores que conducen a la replicación y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la célula

madre (Vermeulen et al., 2003). En condiciones normales, las células diferenciadas se mantienen en un estado no proliferativo o quiescente, pero pueden ser activadas para dividirse a partir de estímulos mitogénicos apropiados, lo cual implica la transducción estrictamente regulada de señales mitogénicas a la maquinaria celular que controla la replicación del material genético así como la correcta segregación a las células hijas (Malumbres and Barbacid, 2009). Cada fase cumple con una función específica para garantizar la correcta división celular; además, para lograr el orden correcto de los eventos que constituyen el ciclo, existen una serie de puntos de control que aseguran que la célula no pase a la siguiente fase del ciclo sin haber completado adecuadamente la fase anterior (Robert, 2015).

La fase G1 es el periodo del ciclo celular que abarca desde el término de la división (mitosis) anterior hasta el inicio de la síntesis de ADN (fase S). Aunque la preparación de la célula para la fase S puede parecer relativamente simple, G1 es en realidad la fase de regulación más importante en el ciclo celular. En esta primera fase de crecimiento, la célula que acaba de dividirse tiene una intensa actividad metabólica, aumentando su tamaño, el número de microtúbulos y generando nuevos orgánulos tales como mitocondrias, ribosomas y estructuras membranosas. Durante G1 es cuando se decide si replicar el ADN celular o si la célula pasa a un estado quiescente denominado G0 en el cual permanecen viables y activas metabólicamente sin proliferar (Ren and Rollins, 2004). Esta decisión, llamada “punto de restricción” (R), se realiza en la fase G1 tardía y está dada por la presencia o ausencia de señales de crecimiento externas. R es un punto de “no retorno”, es decir, una vez

alcanzado, la célula debe concluir su proceso de división (Park and Lee, 2003). Otra característica clave de G1 y que contribuye a la unidireccionalidad de la progresión del ciclo celular, es el cebado de orígenes de replicación con proteínas del complejo de mantenimiento de mini-cromosomas. La unión de estas proteínas a los orígenes de replicación es necesaria para iniciar la síntesis de ADN, pero sólo pueden unirse al ADN en G1 tardía. Por lo tanto, la síntesis de ADN sólo se inicia una vez concluida la transición G1/S (Sherr, 1996; Asghar et al., 2015).

Luego de que la célula ha pasado el punto de restricción continúa con la siguiente fase denominada de síntesis o Fase S. Las proteínas sintetizadas en G1 tardía activan la maquinaria que induce a la replicación del ADN, obteniéndose una única célula con dos conjuntos de cada cromosoma (cromátidas hermanas). Además, en esta fase se realiza la síntesis de histonas y se inicia la replicación de los centriolos, la cual no se completará hasta el inicio de la mitosis (Malumbres and Barbacid, 2009).

En la fase G2, o segunda fase de crecimiento, la síntesis del ARN y proteínas necesarias para la mitosis. En esta fase la célula duplica su tamaño, sintetiza las proteínas necesarias para la descomposición de la envoltura nuclear, la condensación de cromosomas, la formación del huso mitótico, y otros procesos necesarios para la entrada en mitosis. Muchas de estas funciones promotoras de la mitosis no pueden iniciarse hasta que se complete la síntesis de ADN, sirviendo así como una fase de control para prevenir la prematura división celular. La fase G2 concluye cuando los cromosomas empiezan a condensarse iniciándose así la mitosis (Behl and Ziegler, 2014; Robert, 2015).

La mitosis o fase M constituye el evento final del ciclo celular. Es un proceso elaborado dividido en diferentes sub-fases, durante las cuales se producen eventos específicos para separar los cromosomas duplicados y ubicarlos en dos células hijas genéticamente idénticas (Chan et al., 2012). La primera sub-fase a producirse es la profase, en ella las proteínas sintetizadas en G2 inician el proceso de división nuclear o cariocinesis, es decir desintegran la envoltura nuclear, condensan la cromatina e inician la formación del huso mitótico. A esto le sigue la prometafase, un periodo de transición durante el cual las cromátidas hermanas se mezclan hasta posteriormente alinearse en el ecuador de la célula en la siguiente sub-fase denominada Metafase. Las cromátidas hermanas luego se separan a los polos opuestos de la célula en la Anafase, que es seguida de la Telofase, en donde se realiza la división celular, conocida también como citocinesis. Al culminar esta fase, los cromosomas duplicados han sido distribuidos de manera idéntica en cada una de las células hijas (Robert, 2015). La transición del ciclo celular y el paso de una fase a la siguiente se encuentran estrictamente controlados por la activación sucesiva de diferentes complejos proteicos compuestos principalmente por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *por sus siglas en inglés*) en la Tabla 2 se pueden ver algunas ciclinas, las CDKs asociadas y su función en el ciclo celular (Von Angerer et al., 1994; Kastan and Bartek, 2004; Orzáez et al., 2009).

**Tabla 2.** Ciclinas que regulan la actividad de las CDKs.

<b>Ciclinas</b>	<b>CDK asociada</b>	<b>Función</b>
A	CDK1, CDK2	Entrada y transición de la fase S
B1, B2	CDK1	Salida de la fase G2 y mitosis
C	CDK8	Regulación transcripcional
D1, D2, D3	CDK4, CDK6	Transición de la fase G0 a S
E	CDK2	Transición de la fase G0 a S
F	?	Transición de la fase G1 a S
G1, G2	CDK5	Respuesta al daño del ADN
H	CDK7	Activación de CDK
		Regulación transcripcional
		Reparación de ADN
K	?	Activación de CDK
		Regulación transcripcional
T1, T2	CDK9	Regulación transcripcional

**Fuente:** (Vermeulen et al., 2003).

Además durante el desarrollo del ciclo celular existen los puntos de control que se activan en momentos específicos a lo largo del ciclo celular, cuyo propósito es permitir a la célula continuar a la siguiente fase, siempre y cuando la fase anterior se haya realizado libre de errores (Kastan and Bartek, 2004). El principal objetivo de estos puntos de control es asegurar la correcta replicación del ADN, así como proteger, conservar y mantener la fidelidad del genoma de las células de la progenie (Lapenna and Giordano, 2009). Los puntos de control del ciclo celular están regulados por la interacción de los genes cuyo fin es promover o suprimir la división celular. Estos dos tipos de genes se denominan proto-oncogenes y genes supresores de tumores que promueven o inhiben respectivamente la progresión de la célula a través del ciclo celular. La activación de estos puntos de control provoca la detención o arresto del ciclo celular mediante la modulación de las CDKs. Si la reparación no es posible, las células deben ser dirigidas a un proceso de senescencia o muerte celular por apoptosis (Malumbres and Barbacid, 2005). De esta forma se evita la replicación de posibles mutaciones del material genético. La división celular y



la muerte celular son los dos procesos fisiológicos predominantes que regulan la homeostasis de los tejidos en el organismo adulto. En las células normales la diferenciación debe ser estrictamente regulada por los puntos de control, de otro modo la integridad funcional de los tejidos, órganos y sistemas estaría comprometida por tipos y cantidades inadecuadas de células (Lukas et al., 2004). Debido a que la mayoría de células somáticas son quiescentes, el correcto control del re-ingreso, progresión y control del ciclo son fundamentales. Cuando existen alteraciones en los puntos de control o en la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular, se desencadenan patologías como: infarto de miocardio, apoplejía, aterosclerosis, trastornos neurodegenerativos y cáncer (Zhivotovsky and Orrenius, 2010; Li et al., 2012), siendo éste último de nuestro particular interés.

### **2.5.1. Ciclo celular y Cáncer**

El cáncer se caracteriza por un crecimiento descontrolado de las células, donde existe una desregulación del ciclo celular y existe un mayor número de divisiones celulares no programadas. Las células de los tumores poseen características importantes con respecto a las células normales (Hanahan and Weinberg, 2011), estos cambios van de la mano con mutaciones en el material genético que ocasionan pérdida e inactivación de genes supresores tumorales o sobreexpresión en oncogenes, así como inactivación o sobreexpresión de proteínas que participan en las vías de transducción de señales, en el ciclo celular y sus puntos de control (Ponder, 2001). Por lo tanto, la alteración de los mecanismos que regulan el ciclo celular es una causa

común en el desarrollo de varios tipos de cáncer (Malumbres and Barbacid, 2009). La inactivación de genes supresores de tumor como pRb y p53 resulta en la disfunción de las proteínas que normalmente inhiben la progresión del ciclo celular (Sherr and McCormick, 2002). La desregulación del ciclo celular asociado con el cáncer se produce a través de mutaciones de proteínas importantes en los diferentes niveles del ciclo celular. Diversos análisis moleculares han demostrado que la actividad de los complejos ciclina/CDKs se encuentran alterados en tumores humanos (Garrett and Fattaey, 1999; Collins and Garrett, 2005; Shah and Schwartz, 2006; Malumbres et al., 2008a, 2008b). Uno de los complejos ciclina/CDK más alterados en cáncer es el ciclina D/CDK4. La actividad aberrante de este complejo, o la pérdida de pRb, que supone la pérdida del punto de restricción, provoca que la célula pueda proliferar sin necesidad de estímulos mitogénicos, lo que implica la activación de procesos tumorales (Shah and Schwartz, 2006). Una mutación en el gen de la ciclina D1 o CDK4 ha sido reportada principalmente en cánceres epiteliales que incluyen: mama, pulmón, páncreas, gastrointestinal, de endometrio, vejiga, médula ósea, cabeza, cuello, linfomas, hígado, próstata, colon, sarcoma y melanoma (Park and Lee, 2003). La ciclina D1 y o sobreexpresión de ciclina E son responsables de desregulación de la fosforilación de Rb en aproximadamente en el 50% de los carcinomas de pulmón y es un evento temprano en el proceso de previo a la invasión (Tsao et al., 2004). Por otro lado, una mutación en el gen de CDK6 se ha reportado en un pequeño grupo de cánceres mesenquimales que incluyen sarcomas y gliomas; además, está frecuentemente alterado en tumores linfoides que a menudo se asocian a traslocaciones cromosómicas (Lapenna and Giordano, 2009). La

sobreexpresión de ciclina E es típica en cáncer de mama, en el cual, los niveles de esta proteína se encuentran aumentados en un 20%. Además, este porcentaje se incrementa según va aumentando el grado y estadio del tumor. En pacientes con cáncer de ovario, la sobreexpresión de ciclina E también se asocia con un mal pronóstico al igual que en linfomas. También se ha descrito que la ciclina A1 está sobre expresada en leucemia y cáncer testicular (Collins and Garrett, 2005).

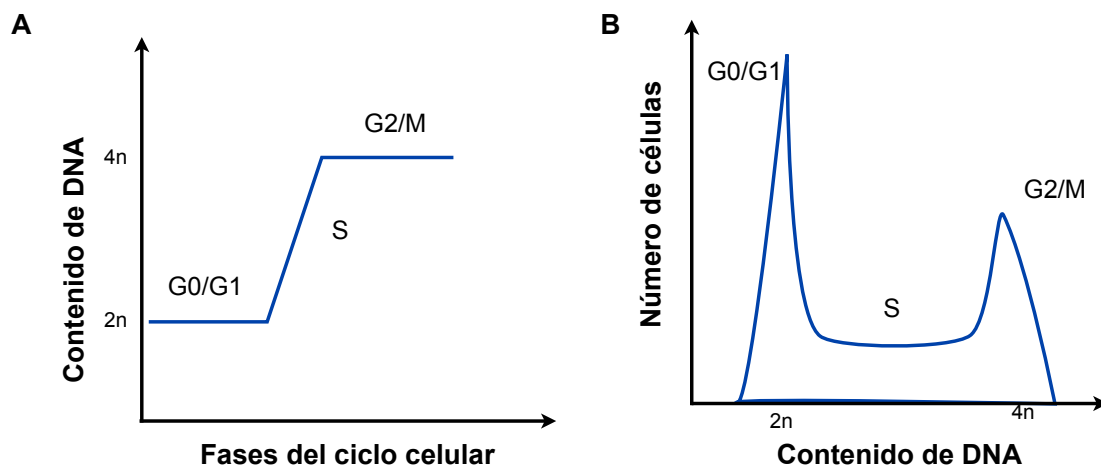
## **2.6. BIOMARCADORES DEL CICLO CELULAR**

Un biomarcador se define tradicionalmente como una “característica” que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Colburn, 2000). En el campo de la investigación en busca de nuevas terapias contra el cáncer, estas “características” pueden consistir en la determinación de genes y proteínas específicas, productos de procesos celulares; así, como la medición de parámetros de carácter anatómicos, fisiológicos y/o morfológicos de las células (de Gramont et al., 2014). La determinación de la proliferación celular puede ser usada para determinar la respuesta de células a estímulos tóxicos particulares. Durante las últimas décadas se han descrito varios métodos para analizar la progresión del ciclo celular. Estos métodos se basan en medir el contenido de ADN, la expresión de una característica metabólica determinante de cada fase del ciclo celular pero también se puede realizar incorporando un marcador de la cinética de proliferación (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004). La cuantificación por

citometría de flujo es el método más empleado (Hanon et al., 1996; Hawley et al., 2004).

### **2.6.1. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo**

La cuantificación de ADN permite establecer el nivel de ploidía, la posición de la célula en el ciclo celular y estimar la frecuencia de células apoptóticas que se caracterizan por un contenido de ADN fraccionado (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004). En términos generales esta técnica se base en el uso de Ioduro de Propidio (IP) como fluorocromo, el cual tiene la capacidad de unirse estequiométricamente al ADN y requiere luz azul como fuente de excitación (por ejemplo láser de ion argón 488 nm), donde la cantidad de señal fluorescente obtenida es directamente proporcional a la cantidad de ADN (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004). Puesto que existen diferencias en el contenido de ADN entre las células pre-replicas (fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) en comparación con las células en replicación (fase S) y las células post-replicas mas las que se encuentran en mitosis (G<sub>2</sub>/M) se puede discriminar entre cada una de las fases (Figura 5.A) (Darzynkiewicz *et al.*, 2010). La distribución del contenido de ADN de una población de células en crecimiento exponencial típicamente se compone de dos picos (células en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> y células en G<sub>2</sub>/M) y un valle de células en fase S (Figura 5.B). Debido a que el IP también marca el ARN de doble cadena, este último es degradado mediante la adición de ARNasa (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004).



**Figura 5.** Representación gráfica del contenido de ADN en el ciclo celular. **A)** Las células post-replicas (G2/M) contienen el doble de ADN que las células pre-replicas (G0/G1). **B)** Esquema del Histograma de frecuencias de la población celular obtenido mediante citometría de flujo, donde las células en fase G0/G1 y G2/M presentan picos según la cantidad de ADN, mientras las células en fase S se distribuyen entre los picos.

## **2.7. PRODUCTOS NATURALES COMO AGENTES ANTITUMORALES INHIBIDORES DEL CICLO CELULAR**

Actualmente existen varios tratamientos contra el cáncer, entre ellos podemos citar la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia, la terapia génica o incluso la nanoterapia (Weissleder and Pittet, 2008). En la quimioterapia, generalmente se utiliza una variedad de compuestos químicos denominados antineoplásicos para eliminar o detener el crecimiento de las células tumorales. A pesar de los grandes esfuerzos realizados a nivel mundial en la búsqueda de fármacos para el tratamiento del cáncer, muy pocos pueden ser catalogados como exitosos (Collins and Workman, 2006). Uno de los

principales inconvenientes en la búsqueda de fármacos efectivos es que a pesar de la complejidad de las células tumorales éstas se asemejan en algunos aspectos con las células normales. Como ya se mencionó anteriormente en el cáncer existe una desregulación del ciclo celular y existe un mayor número de divisiones celulares no programadas, por lo tanto, la inhibición del ciclo celular representa una oportunidad de intervención terapéutica.

Según la Agencia de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos de Norte América, aproximadamente el 66% de los fármacos para el cáncer, son metabolitos secundarios, análogos semi-sintéticos o sintéticos basados en farmacóforos obtenidos de metabolitos secundarios (Cragg and Newman, 2013b). La mayoría de los medicamentos anti-cáncer obtenidos hasta inicios de 1990 alteran la proliferación de las células tumorales mediante la inhibición o dañando eventos del ciclo celular, lo que conducirá a la activación de los puestos de control, deteniendo el ciclo celular e induciendo apoptosis (Senese et al., 2014).

Los fármacos que actúan sobre el ciclo celular se pueden clasificar de acuerdo con su diana molecular, los mismos que revisaremos a continuación y se hablará de algunos ejemplos relevantes obtenidos de fuentes naturales.

### **2.7.1. Fármacos cuyo blanco molecular son los microtubulos**

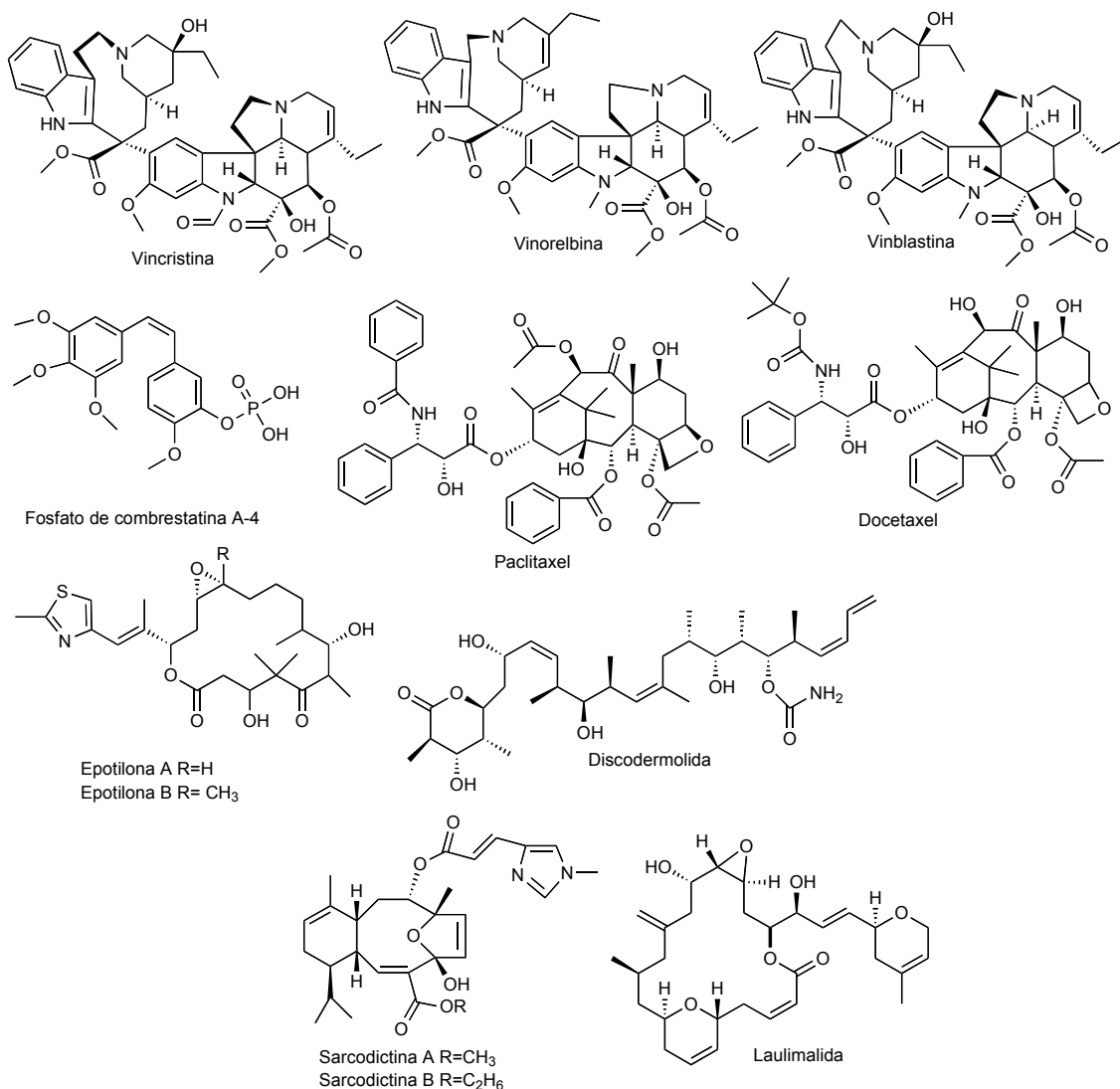
Esta clase de medicamentos altera la dinámica de microtúbulos, dando lugar a

la formación de un huso anormal y una alineación incorrecta de los cromosomas. Este grupo de fármacos se dividen en dos grupos:

**1. Agentes desestabilizadores de microtúbulos**, como los alcaloides de la vinca (vincristina, vinorelbina y vinblastina) obtenidos de *Catharanthus rosea* los cuales impiden la polimerización de microtúbulos (Jordan and Wilson, 2004). La vinblastina provoca la despolimerización de monómeros de tubulina y de los microtúbulos mediante la unión microtúbulos  $\beta$ -tubulina en una región adyacente al sitio de unión GTP conocido como el dominio de la vinca (Cragg et al., 2006). Otros agentes inhibidores de los microtubulos son las combretastatinas A y B, aisladas del "Sauce Bush", *Combretum caffrum* (Eckl. y Zeyh.) Kuntze (Combretaceae). Las combretastatinas son una familia de estilbenos que actúan inhibiendo a los microtúbulos en el sitio de dominio de unión de colchicina además actúan como agentes anti-angiogénicos, provocando la disminución vascular en los tumores mediado por necrosis (Jordan and Wilson, 2004; Bhanot et al., 2011).

**2. Agentes estabilizadores de microtúbulos**, los taxanos (Paclitaxel y Docetaxel) obtenidos de *Taxus brevifolia* Nutt. y *Txus baccata*, estimulan su polimerización (Bhalla, 2003; Hennenfent and Govindan, 2006; Kintzios, 2006; Bhanot et al., 2011; Chan et al., 2012). Los taxanos han mostrado actividad antitumoral en una amplia gama de tumores, particularmente de mama, de ovario, de pulmón de células no pequeñas y de cabeza y cuello. Aunque se desarrollan fármacos inhibidores de los microtúbulos selectivos de las células en división activa en virtud de la intensa rotación y la reestructuración de husos

durante la mitosis, se observan efectos indeseables en las células que no proliferan produciéndose comúnmente toxicidad mieloide y neurotoxicidad (Chan et al., 2012). Otros compuestos que imitan a los taxanos, incluyen los metabolitos microbianos como las epotilonas, y los metabolitos de invertebrados marinos, como discodermolida, eleuterobina, sarcodactilis y la laulimalida (Cragg and Newman, 2005). En la figura 6 se muestran algunos de estos medicamentos antimicrotubulares.



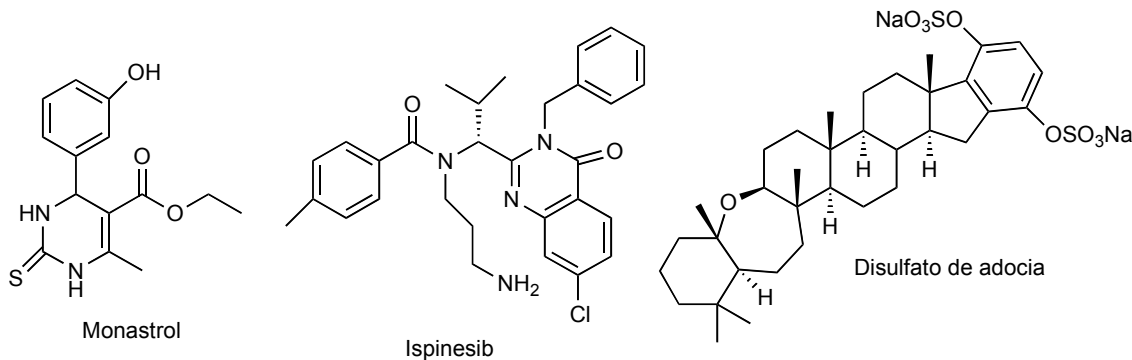
**Figura 6.** Medicamentos con blanco molecular los microtubulos



### 2.7.2. Proteínas anti-motoras

Basándose en terapia anti-microtúbulos, nuevos objetivos y estrategias se diseñaron para explotar la dinámica del huso y funcionalidades. La quinesina Eg5, una proteína motora final la cual es responsable de la separación del centrosoma y la formación del huso bipolar (Kops et al., 2005). Comprometer las actividades de Eg5 conduce a la formación de ejes monopolares, un ensamble anormal de los cromosomas, un arresto SAC-dependiente y posiblemente la muerte celular. El monastrol, descubierto a través de un tamizaje fenotípico utilizando extractos mitóticos, se informó como la primera molécula pequeña capaz de inhibir Eg5 (Nagle et al., 2006). El monastrol ha sido validado como un atractivo medicamento contra el cáncer (Keen and Taylor, 2009). Otra molécula con similares efectos es el ispinesib, un derivado de la quinazolinona, la cual produce arresto en mitosis cuando las células son tratadas a dosis submicromolares éste arresto posteriormente inducirá apoptosis (Keen and Taylor, 2009).

EL disulfato de adocia (AS-2) aislado de la esponja marina *Haliclona* inhibe competitivamente la interacción del dominio quinesina motor con los microtúbulos en concentraciones micromolares. Aunque AS-2 era aparentemente específico para quinesinas como una clase enzimática, no presenta selectividad entre las tres diferentes quinesinas (Nagle et al., 2006). En la figura 7 se pueden ver las estructuras de estos compuestos.



**Figura 7.** Medicamentos inhibidores de proteínas antimotoras

### 2.7.3. Anti-quinasas quinasas

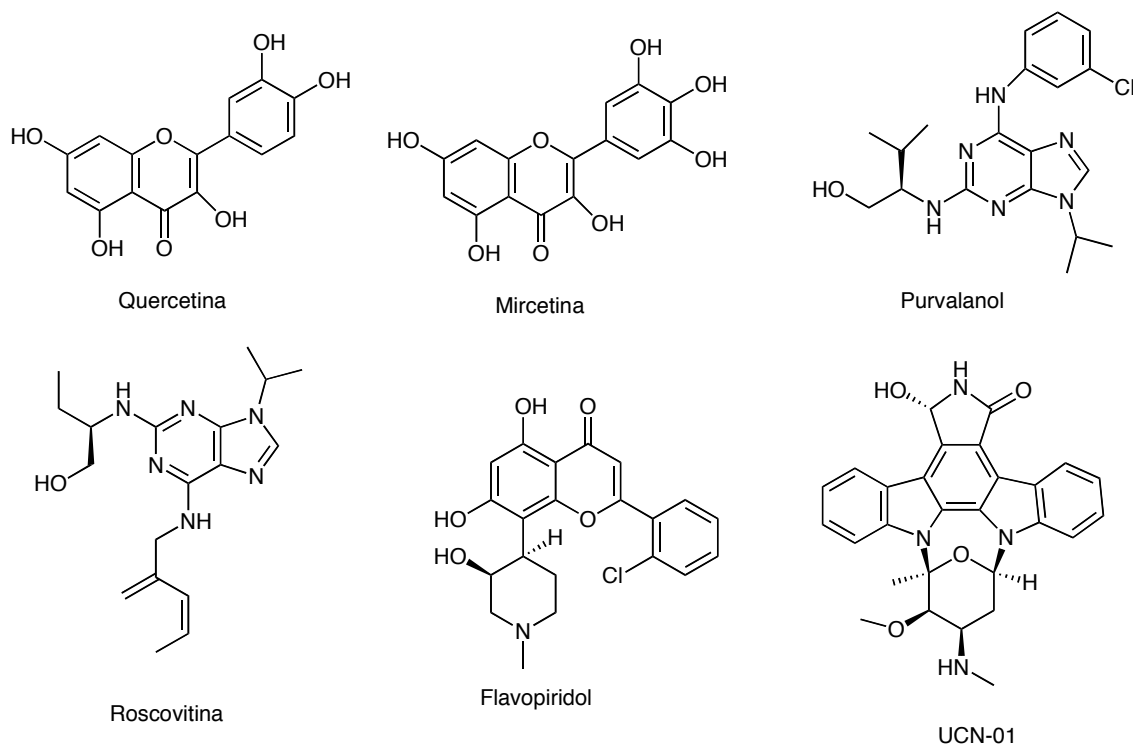
El rol fundamental que desempeñan las CDK y otras quinasas en el control del ciclo celular y sus puntos de control plantean la posibilidad de diseñar estrategias terapéuticas que actúen sobre estas moléculas (Malumbres and Barbacid, 2005); el diseño de inhibidores que bloquean la actividad de CDK son la estrategia más directa y prometedora (Vermeulen et al., 2003). Tres propiedades hacen atractivo a los inhibidores de CDK como agentes anti-tumorales. Primero, son agentes anti-proliferativos potentes, que detienen a las células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub>/M. En segundo lugar, desencadenan la apoptosis, solos o en combinación con otros tratamientos. En tercer lugar, en algunos casos, la inhibición de CDKs contribuye a la diferenciación de las células (Park and Lee, 2003).

La flavona quercetina ejerce su efecto anti tumoral a través de bloqueo de la progresión del ciclo celular en la interfaz de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, consistente con la inhibición de CDK, y un análogo cercano, la miricetina, muestra una IC<sub>50</sub> cerca a 10  $\mu$ M en comparación con Cdk2. El flavopiridol es totalmente sintético, pero

la base para su estructura es la rohitukina, aislada como componente responsable de la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de *Dysoxylum binectariferum* Hook (Meliaceae). El flavopiridol y el flavopiridol deshalogenado muestran propiedades citotóxicas contra líneas de células tumorales. El flavopiridol es el primer inhibidor de CDK en continuar con los ensayos clínicos. El flavopiridol tiene mayor actividad para CDKs y GSK3 $\beta$  y es moderadamente más selectivo para CDK4 y CDK6, que para CDK1 y CDK2. También se ha demostrado que inhibe el complejo ciclina H-CDK7 y complejo P-TEFb que contiene-CDK9 ciclina T1. El flavopiridol ha mostrado resultados prometedores en la terapia en combinación, con paclitaxel mejorando su actividad en ensayos humanos (Vermeulen et al., 2002, 2003; Sridhar et al., 2006; Cheok et al., 2007; Malumbres et al., 2008a; Diaz-Padilla et al., 2009; Chan et al., 2012).

Otro agente sintético basado en un modelo de producto natural es la roscovitina que se deriva de la olomucina, aislada originalmente de los cotiledones de rábano, *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae). La inhibición de la progresión de la fase G1/S a G2/M se observó tanto para la olomoucina como para la roscovitina en una manera dosis dependiente. La olomoucina inhibe las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), y su modificación química resultó en un inhibidor más potente, la roscovitina; que actualmente está en fase II de ensayos clínicos (Sridhar et al., 2006). Un mayor desarrollo de esta serie, a raíz de la síntesis de una biblioteca enfocada a través de técnicas de química combinatoria, ha llevado al estudio del purvalanol que es aún más potente, y se encuentra en fase de desarrollo preclínico (Vermeulen et al., 2002, 2003).

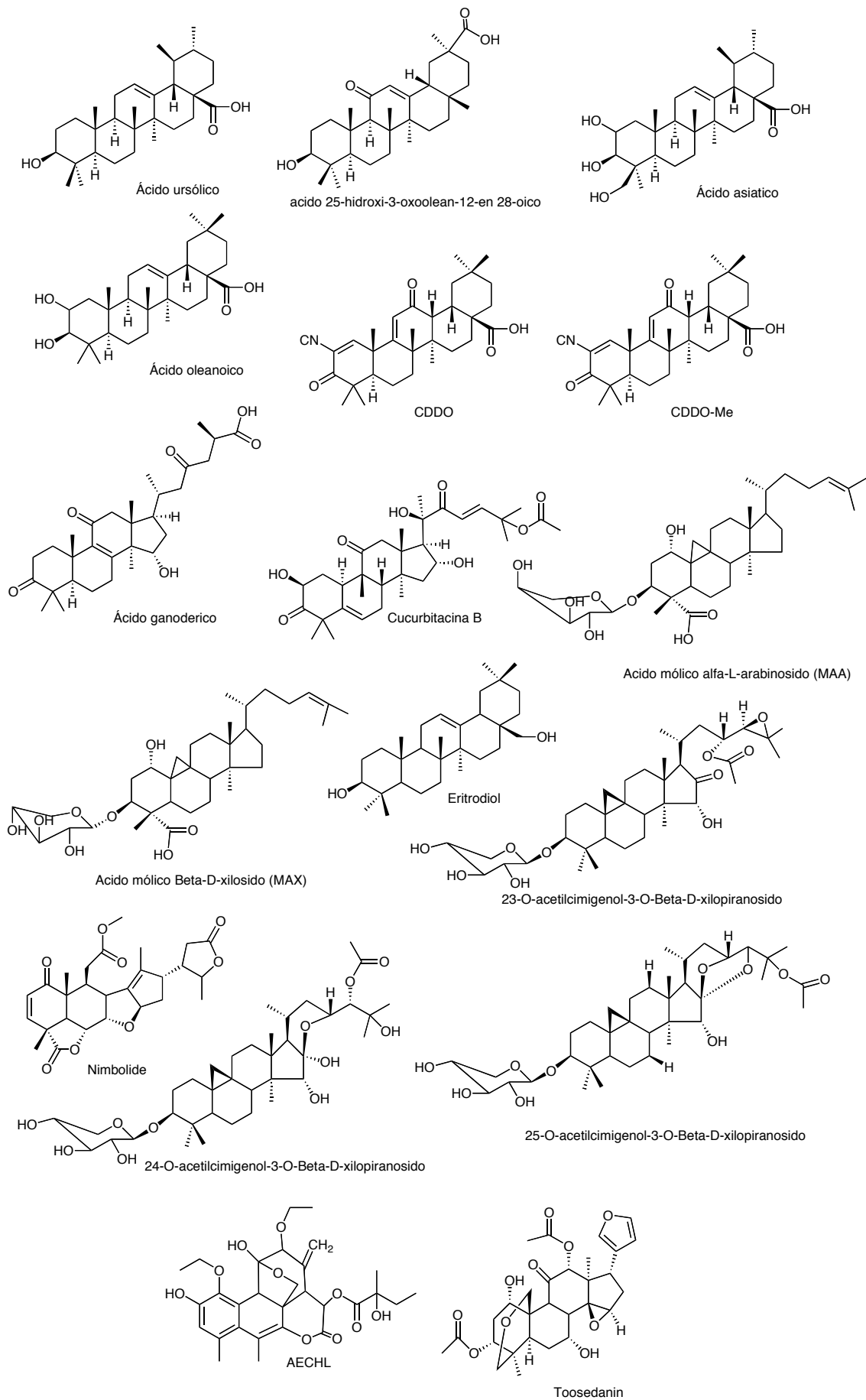
El UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) es una estaurosporina, análogo aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces* sps. El UCN-01 se asocia con la detención de las células en el ciclo celular en la fase G1/S, la inducción de p21cip / Waf1 y desfosforilación de ambos CDK2 y PRB. El UCN-01 también puede inhibir la actividad de CDK1 y CDK2. Esta inhibición conduce a la activación de ciclina B/CDK1 y marcada abrogación del punto de control G2-fase, la promoción de las células al someterse a mitosis temprana y muerte apoptótica posterior, en lugar de la detención del ciclo celular. Varios estudios de fase I se han llevado a cabo con UCN-01, tanto como agente único y en combinación con la quimioterapia citotóxica (Diaz-Padilla et al., 2009).



**Figura 8.** Medicamentos antiquinasas

## **2.8. TRITERPENOS INHIBIDORES DEL CICLO CELULAR**

Los triterpenos constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios derivados del escualeno o de precursores a cíclicos de 30 átomos de carbono (Dzubak et al., 2006). El estudio sistemático de plantas con antecedentes etnomédicos, ha conducido frecuentemente al aislamiento de diversos triterpenos antibacteriales, antineoplásicos, y con otras funciones farmacéuticas. En la figura 9 y en la tabla 3 se muestran algunos triterpenos con potencial inhibidor del ciclo celular.



**Figura 9.** Triterpenos Inhibidores del ciclo celular

**Tabla 3.** Triterpenos con efectos sobre el ciclo celular en células tumorales

Compuesto	Línea celular	Efecto en la proliferación	Referencia
<b>Ursano</b>			
Acido ursólico	HCT15 A549	Arresto en G0/G1 Apoptosis Inhibición de p21Waf1/CIP1	(Li et al., 2002)
Acido 25-hidroxi-3-oxoolean-12-en-28-oico (AMR)	CEM/VLB SW620/Ad-300	Arresto S-G2/M	(Ramachandran et al., 2003)
Ácido asiático	MCF-7 MDA-MB-231	Arresto S-G2/M Apoptosis. Elevación p21/WAF1 Inhibición ciclina B1, A, Cdc2 y Cdc25C	(Bishayee et al., 2011)
<b>Oleananos</b>			
Acido oleanoico	HCT15	Arresto en G0/G1	(Li et al., 2002)
Acido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oico (CDDO)	MCF-7	Arresto en S/G2-M Apoptosis. Regula la expresión de ciclina D1, p21Waf1/CIP1 y Bcl-2	(Bishayee et al., 2011)
Acido C-28 metil ester de 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oico (CDDO-Me)	4T1	Arresto en S/G2-M.	(Bishayee et al., 2011)
Acido Ganoderico (GADM)	DM MCF-7	Arresto en G0/G1 y apoptosis Inhibe CDK2, CDK6 y p-Rb	(Wu et al., 2012)
<b>Cucurbitacinas</b>			
Cucurbitacina B	MG-63, SAOS-2,	Arresto en S/G2-M Apoptosis. Inhibición of ERK, Akt, y mTOR proteínas	(Lee et al., 2011)
23,24-Dihydrocucurbitacina B (DHCB)	MCF-7	Arresto en S/G2-M Apoptosis.	(Yang et al., 2007)

**Tabla 3.** Triterpenos con efectos sobre el ciclo celular en células tumorales  
(continuación)

<b>Cicloartanos</b>				
Acido molico $\alpha$ -L-arabinosa (MAA)	Ca Ski	Arresto en S/G2-M Inducción de células hipodiploides.		(Wong et al., 2012)
Acido molico $\beta$ -D-xilosa (MAX)	Ca Ski	Arresto en S/G2-M la inducción de las células hipodiploides.		(Wong et al., 2012)
23-O-acetilcimigenol-3-O-b-D-xilopiranososa	HepG2, R-HepG2	Arresto en S/G2-M		(Tian et al., 2005a)
24-O-acetilcimigenol -3-O-b-D-xiopiranososa	HepG2, R-HepG2	Arresto en S/G2-M		(Tian et al., 2005a)
25-O-acetilcimigenol-3-O-b-D-xilopyranosa	HepG2, R-HepG2	Arresto en S/G2-M		(Tian et al., 2005a)
<b>Miscelanea</b>				
AECHL-1	MDA-MB-231, MCF-7, PC3	Arresto en S/G2-M		(Lavhale et al., 2009)
Nimbolida	B16F10 HT-29	Arresto en G0/G1 Arresto en S/G2-M Incremento de p21, 1 y ciclina D1		(Roy et al., 2006)
Toosendanina	U937	Arresto en G0/G1		(Zhang et al., 2005)
Eritrodiol	HC-29	Arresto en G0/G1 y apoptosis		

Sin duda, las investigaciones previamente descritas para algunos triterpenos hacen que este tipo de compuestos, se consideren como promisorios para el desarrollo de nuevos agentes con propiedades tanto antiinflamatorias como inhibidoras del ciclo celular.



## 2.9. *Parthenium argentatum*

El *Parthenium argentatum* es un arbusto que crece en las zonas áridas del norte del país y sur de los Estados Unidos (Figura 10), el cual tiene como nombre vulgar el de guayule, vocablo que literalmente significa “árbol de hule”. Fue referido por primera vez por J. M. Bigelow en 1852, y sus características botánicas fueron descritas por Asa Gray de la Universidad de Harvard en 1859 (Hammond and Polhamus, 1965).



**Figura 10.** Arbusto de *Parthenium argentatum*

El hule, en el guayule, está almacenado como una suspensión coloidal de látex confinado en células individuales y se ubica prácticamente en todos los órganos de la planta, tallos, raíces y hojas. (Rollins, 1950). Se ha encontrado que esta especie es la única de este género que contiene cantidades suficientes de hule para ser de importancia económica. (Thompson and Ray, 1989). De todas las fuentes de hule natural solo el de *Hevea brasiliensis* y el de *P. argentatum* ha sido puesto en circulación en el mercado mundial.

El interés de producir hule a partir del guayule se remonta al año 1852, año en que fue descubierto, continuando hasta el final de la II Guerra Mundial, cuando

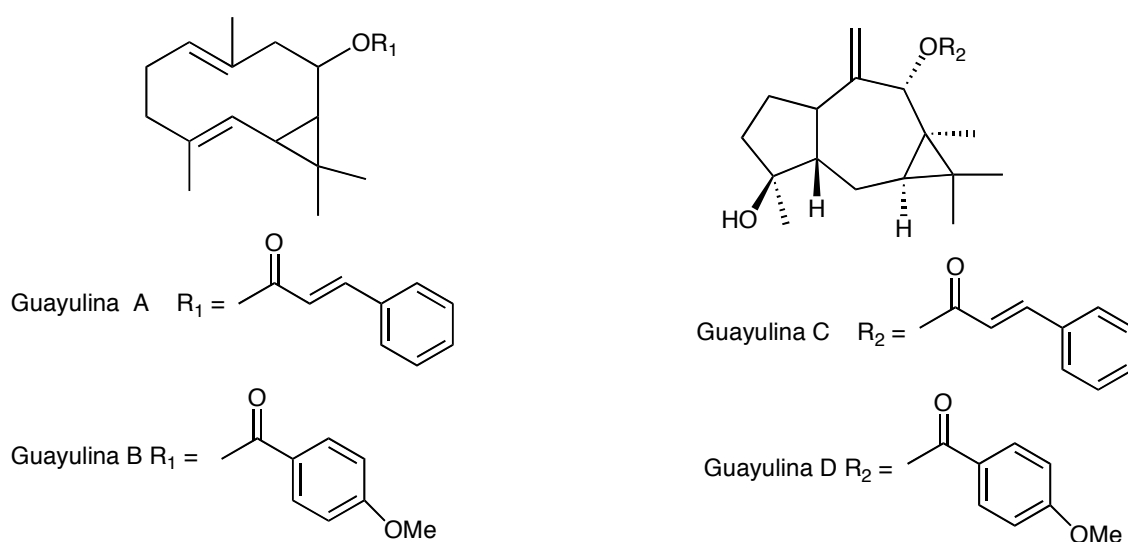
con el surgimiento de hules sintéticos disminuye el interés por las fuentes renovables de hule natural. El aprovechamiento del guayule de manera industrial se llevó a cabo en México de 1903 a 1951 exportando a los Estados Unidos 125,000 toneladas de hule (Domínguez, 1978).

La extracción se realizaba por el método de flotación que era el económicamente más atractivo (Schloman et al., 1983), este consistía en colocar el material vegetal seco y molido en un estanque. Posteriormente se adicionaba una solución diluida de hidróxido de sodio, con lo que se facilitaba la extracción del látex. De esta forma el hule, en mezcla con un residuo vegetal, flotaba en la solución alcalina. El hule se purificaba mediante lavados con acetona. Finalmente, la recuperación de acetona mediante destilación, dejaba un residuo al cual se le llamo "la resina".

La investigación química orientada a aislar e identificar metabolitos secundarios distintos al hule se inicio en 1911, año en el que se publicó el aislamiento del parteniol (un alcohol sesquiterpenico) a partir de un extracto acetónico del guayule, mas tarde Walter en 1944 describió las propiedades del parteniol, posteriormente Haagen-Smit en 1948 propuso una estructura para el parteniol, siendo posteriormente corregida en 1986 por Martínez V. (Whitworth and Whitehead, 1991).

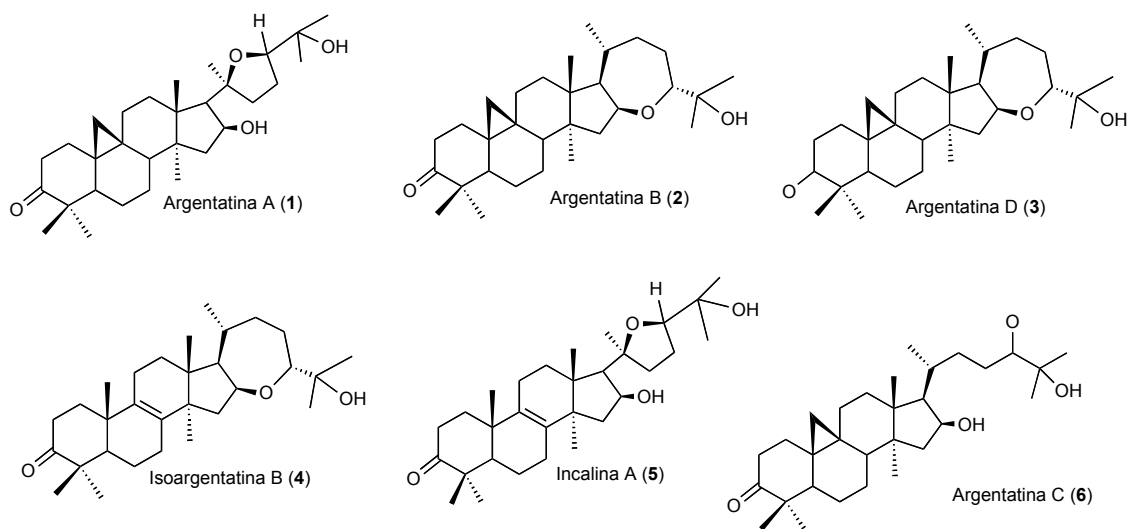
Por otra parte Haagen-Smit en 1944 informo las propiedades físico-químicas, la composición y la distribución de los aceites esenciales encontrados en el guayule ( $\alpha$ -pineno, limoneno felandral, entre otros).

Además de aceites esenciales, se han aislado por métodos cromatográficos del extracto etanólico de esta especie, flavonoides metoxilados derivados de la quercetagina (Schloman et al., 1983). Adicionalmente, en 1970, Romo de Vivar y colaboradores, aislaron dos sesquiterpenos llamados guayulinas A y B, a partir del extracto etanólico, así como dos triterpenos del tipo cicloartano las argentatinas A y C. Posteriormente Martínez-Vázquez y Rodríguez-Hann en 1986, aislaron e identificaron las guayulinas C y D, ver figura 11.



**Figura 11.** Estructuras de las guayulinas aisladas de *P. argentatum*

Ese mismo año Romo de Vivar y colaboradores, lograron aislar la isoargentatina B, a partir de un extracto acetónico de la resina y en 1990, este mismo grupo de investigadores, aislaron la argentatina D a partir de un extracto hexánico de las raíces de *P. argentatum*, ver figura 12.



**Figura 12.** Estructura de los triterpenos aislados de *P. Argentatum*

## 2.10. LA RESINA

Como una fuente natural de hule, el guayule ha sido intensamente estudiado y es conocido que por cada kilogramo de hule obtenido se obtiene al menos un kilogramo de resina. Desde un inicio, se pensó que para hacer más atractiva la explotación del guayule, era necesario buscar un beneficio económico adicional en la resina, por lo tanto, el conocer la constitución química de este residuo se convirtió en un asunto de interés y las primeras investigaciones hechas a la resina fueron con fines industriales usándola en la fabricación de adhesivos y barnices. Tomando en cuenta que las argentatinas comprenden 27% de la resina, (Komoroski et al., 1986) se puede disponer de cantidades considerables de estos metabolitos. Aunado a su gran parecido estructural con compuestos esteroides, son una fuente potencial de intermediarios susceptibles a sufrir transformaciones químicas, esto con el propósito de obtener compuestos con posibles propiedades biológicas (Martínez et al., 1990).

Nuestra experiencia (Oviedo-Chavez *et al.*, 2004; Oviedo-Chavez *et al.*, 2005; Flores-Rosete and Martinez-Vazquez, 2008) al igual que la de otros grupos (Recio *et al.*, 1995b; Kinoshita *et al.*, 1998; Akihisa and Yasukawa, 2001; Akihisa *et al.*, 2003; Dzubak *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2007) nos indica que algunos triterpenos son buenos candidatos para la búsqueda de compuestos activos que interfieren con el proceso inflamatorio y tienen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano, por lo que en el presente trabajo se utilizó las argentatinas A (1), B (2) y D (3) y algunos de sus derivados para la búsqueda de moléculas activas en modelos de inflamación y citotoxicidad, con la finalidad de obtener compuestos candidatos para desarrollar fármacos que ayuden a la quimio prevención o la quimioterapia del cáncer, mediante su interacción con dianas terapéuticas relacionadas con la inflamación, y cáncer para ello se desarrolló la metodología descrita a continuación.

### **3. HIPOTESIS**

De acuerdo con los antecedentes de la literatura es factible suponer que las Argentatinas A (1) y B (2) poseen propiedades citostáticas y antiinflamatorias. Por lo que las transformaciones químicas de estos triterpenos permitirán obtener compuestos con mayor potencia farmacológica.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citostática de las Argentatinas A (1) y B (2) y algunos de sus derivados.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar e identificar las argentatinas A (1), B (2) y D (3) a partir de la resina obtenida como subproducto durante el proceso de obtención del hule a partir de la especie *Parthenium argentatum* (Gray).
- Determinar el efecto antiinflamatorio de las Argentatinas A (1), B (2) y D (3) en ratones.
- Obtener mediante transformaciones químicas derivados de las Argentatinas A (1), B (2) que posean efecto antiinflamatorio.
- Determinar el efecto inhibitorio del ciclo celular de la Argentatina B (2) en líneas celulares de cáncer humano.
- Obtener mediante transformaciones químicas derivados de las Argentatina B (2) que inhiban de manera más eficiente la proliferación de líneas celulares de cáncer humano.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio y el efecto inhibitorio del ciclo celular de los derivados obtenidos.

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS GENERALES**

Para las extracciones se emplearon disolventes grado industrial destilados en el laboratorio. Los disolventes y reactivos empleados para la purificación, el análisis y las reacciones fueron de grado analítico (Sigma).

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron siguiendo técnicas convencionales empleando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice F<sub>254</sub>.

Los procedimientos de cromatografía en columna abierta se efectuaron en columnas de vidrio de diferentes capacidades y se empleó gel de sílice F<sub>254</sub> como adsorbente. El revelado se realizó con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (350 nm) y con una solución de sulfato cérico.

Los puntos de fusión de cada compuesto en estudio se determinaron en un equipo Fisher Johns y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT-55X, y los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se adquirieron a 200 y 300 MHz y 50 ó 75 MHz respectivamente en los equipos Varian Gemini 200, Unitv 300, Eclipse 300 o Broker-Avance 300. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm ( $\delta$ ), y las constantes de acoplamiento (*J*) se informaron en Hz. El tetrametilsilicio (TMS) se empleó como referencia interna. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Jeol AH505HR.



## **5.2. RESINA**

La resina, un subproducto que es obtenido durante el proceso de industrialización de la especie *P. argentatum* (Gray), fue amablemente donada por la Comisión Nacional de Zonas Áridas (CONAZA) ubicada en Saltillo, Coahuila.

## **5.3. AISLAMIENTO DE LAS ARGENTATINAS A, B y D:**

110.39 gramos de resina de *P. argentatum*, se disolvieron en hexano y se percolaron a través de una columna usando como fase estacionaria 750 gr. de gel de sílice 60 (0.015-0.040 mm) de la marca Merck, la cual fue posteriormente eluida con disolventes de polaridad ascendente hexano, AcOEt y metanol.

La caracterización de los tres triterpenos se efectuó por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura (Komoroski et al., 1986; Martínez et al., 1990; Romo de Vivar et al., 1990).

## **5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA PRODUCIDA POR LAS ARGENTATINAS A, B, D Y SUS DERIVADOS**

### **5.4.1. Modelos de inflamación in vivo**

#### **5.4.1.1. Animales de laboratorio**

Los ratones de la cepa CD-1 utilizados en los diferentes ensayos se obtuvieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, se manipularon de acuerdo con las condiciones establecidas en la NOM-062-ZOO-1999. Se colocaron en cajas de polipropileno traslúcidas de paredes continuas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad de 50-60 %, con acceso *ad libitum* de agua y dieta estándar de laboratorio.

#### **5.4.1.2. Inflamación inducida por 13-acetato de 12 O tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón**

Para determinar la actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados **1**, **2** y **3**, y los derivados **1a-1h** y **2a- 2e** se utilizó el modelo de inflamación en la oreja de ratón inducida por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA, Sigma).

Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente (De Young et al., 1989) con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez et al., 2004). Así, se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con pesos entre 25-30 g. Los animales se dividieron al azar en grupos (uno por cada tratamiento) de 4 a 8 animales, los cuales se pesaron, marcaron y anestesiaron por vía *i.p.* con pentobarbital sódico (Sedalforte®) a una dosis de 31.5 mg/kg. Una vez anestesiados los ratones, se aplicó por vía tópica 2.5 µg de TPA, disueltos en 10 µL de etanol, en ambos lados de la oreja derecha (5 µL por lado). La oreja izquierda sólo recibió el vehículo correspondiente (5 µL a cada lado). Después de 10 minutos, se aplicaron las sustancias de prueba disueltas en acetato de

etilo y administradas sobre ambos lados de la oreja derecha en dosis de 0.05 a 1 mg/oreja. Se aplicó indometacina disuelta en una mezcla de etanol y acetona (1:1 v/v) en un intervalo de dosis de 0.046 – 0.465 mg/oreja en la oreja derecha del grupo control como fármaco de referencia. El grupo control recibió en la oreja derecha 20 µL de acetato de etilo. La oreja izquierda de cada animal sirvió como control negativo. Después de 4 h, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se retiró una biopsia de 9 mm de diámetro de ambas orejas de cada animal.

La inflamación se evaluó como la diferencia de pesos (en mg) entre la biopsia de la oreja derecha, respecto a la biopsia de la oreja izquierda de cada animal. El porcentaje de inhibición del edema (*IE%*) se calculó mediante la ecuación (1), donde A corresponde al valor promedio del edema en el grupo control, y B al valor promedio del edema del grupo tratado con las sustancias de prueba o el fármaco de referencia.

$$\%IE = 100 - \left(\frac{B}{A} \times 100\right) \quad (1)$$

Los datos de peso se expresaron como la media ± EE de 4-8 ratones. Se determinaron las diferencias estadísticas entre el control y los grupos tratados utilizando un ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. P <0,05 los valores fueron considerados significativos. El porcentaje de inhibición del edema para cada dosis se calculó como se describe anteriormente. La dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se calculó a partir de la ecuación de regresión utilizando datos significativos.

## **5.4.2. Modelos “*in vitro*”**

### **5.4.2.1. Ensayo de inhibición *in vitro* de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)**

La capacidad de la argentatina B (2) para inhibir la COX-2 fue determinada usando un ensayo de detección colorimétrico de inhibición de la COX-2 (Cayman Chemical, artículo 56031). La determinación se logró siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.4.2.2. Producción del óxido nítrico en macrófagos de ratón**

#### **5.4.2.2.1. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón**

Se siguió el método previamente descrito, para el cultivo y aislamiento de células primarias de los macrófagos peritoneales (Oviedo-Chávez et al., 2004). Un grupo (n = 3) de ratones hembras CD-1 con un rango de peso de 25-30 g, fueron inyectados *i.p.* con 1 mL de medio de tioglicolato Brewer (BD Dioxon, Becton Dickinson de México) al 3 % (p/v), 3 días antes de la cosecha. Después de ese tiempo, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Se administró en las paredes peritoneales 10 mL de medio de cultivo modificado Dulbecco's (DMEM; GIBCO, Gran Isla, NY, EU) suplementado con penicilina (50 µg/mL), estreptomina (50 UI/mL) y suero bovino fetal (SBF, GIBCO) al 5 %. Se aplicó un masaje abdominal intenso y se obtuvo el líquido peritoneal, que contiene a las células de exudado peritoneal. El líquido obtenido se centrifugó durante 6 min (3400 rpm, 20 °C). El botón celular se suspendió en DMEM, y las células se sembraron en placas de 24 pozos (Becton Dickinson, Osnard, California, EU) a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Al término del tiempo,

las células no adherentes se lavaron y se adicionó DMEM fresco suplementado con SBF al 10%. Las células fijadas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, con o sin 50 µL de lipopolisacárido 10 µg/mL (LPS, de *E. coli* serotipo 055:B5, Sigma) y en la ausencia o presencia de compuestos de la prueba **1** y **2** disueltos en EtOH en concentraciones de 3.1 a 100 µM. La concentración final de EtOH en el sobrenadante de cultivo celular fue de 0.1%, y esta concentración no mostró ningún efecto en los ensayos.

#### **5.4.2.2.2. Determinación de concentración de óxido nítrico (ON)**

La producción de óxido nítrico se determinó indirectamente mediante la cuantificación de nitritos acumulados en el medio de cultivo celular a través de la reacción de Griess (Dirsch et al., 1998). Se preparó el reactivo de Griess constituido por una mezcla en relación 1:1, de una disolución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 5 % y otra disolución de dihidroclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina al 0.1% en agua desionizada. Para llevar a cabo la reacción, se colocaron en una placa de 96 pozos 100 µL del reactivo anterior, y 100 µL de los sobrenadantes de los cultivos celulares, a 20°C durante 10 min y sin agitación. A continuación la densidad óptica (DO) de cada muestra se leyó en un lector de microplacas (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.) a 515 nm. La concentración de nitritos (µM) se conoció por interpolación de los resultados de DO en una curva estándar construida con concentraciones conocidas de NaNO<sub>2</sub> desde 0.01 hasta 50 µM. Las densidades ópticas se relacionaron directamente con la concentración de NO. La inhibición de la cantidad de NO

(%) se calculó de acuerdo con la ecuación (2), en donde A corresponde al valor promedio de concentración de NO en el grupo control, y B es la cantidad de NO producida por cada grupo de ensayo.

$$\%I = 100 - \left(\frac{B}{A} \times 100\right) \quad (2)$$

## **5.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA Y CITOSTÁTICA PRODUCIDA POR LA ARGENTATINA B y SUS DERIVADOS**

### **5.5.1. Cultivo celular**

La línea celular de cáncer colorrectal RKO fue donada por la doctora Patricia Ostrosky-Wegman (Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y se cultivó en medio suplementado-DMEM (100 unidades / ml de penicilina G, 100 mg / ml de estreptomina, 0,25 mg / ml de anfotericina B), 2 mM L-glutamina con FBS al 10% (v/v, Invitrogen), en un incubador humidificado (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). para los experimentos, 5x10<sup>4</sup> células / cm<sup>2</sup> se sembraron en este medio durante la noche.

### **5.5.2. Evaluación del Efecto citotóxico**

El efecto de la argentatina B y sus derivados se determinó a una concentración de 50 µM para determinar la ventana farmacológica.

Posteriormente, cada compuesto se evaluó a diferentes concentraciones (dependiendo del rango de potencia), con el fin de obtener las curvas concentración-respuesta y calcular la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>).

### **5.5.3. Ensayo de citotoxicidad fluorométrico**

El ensayo fluorométrico (FMCA) se basa en el seguimiento de la fluorescencia que surge de la fluoresceína que se produce como resultado de la hidrólisis por las células con membranas celulares intactas (Larsson and Nygren, 1993; Csoka et al., 1994; Lindhagen et al., 2008). Cada pocillo se sembró con 180 µL de suspensión celular, que contienen aproximadamente 5.000 células. Las placas se incubaron a continuación durante 24 h a 37 °C bajo una atmósfera que contiene 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 h, las células se trataron con cinco concentraciones diferentes (15-75 mM) de **2** y los derivados **2a-2l** disueltos inicialmente en etanol (EtOH 0,1%). La doxorubicina se utilizó a cinco concentraciones diferentes (0,01-1 mM) como control positivo. Una vez que el tiempo de incubación había terminado, se retiró el medio por aspiración, y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadió diacetato de fluoresceína (0,0317 mg / mL) y las células se incubaron durante 5 min. en la oscuridad. La viabilidad se cuantificó por triplicado en un fluorómetro de microplacas Fluoroskan Ascenso (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finlandia) (Ex: 485 nm, Em: 538 nm). La actividad de los compuestos se informó como un efecto sobre la supervivencia celular definida por la fluorescencia en los pocillos experimentales, considerando a las lecturas de

control como 100% de viabilidad y se determinó la  $IC_{50}$  de cada compuesto, utilizando 7 dosis comprendidas entre 0 y 100  $\mu$ M.

#### **5.5.3.1. Ensayo de exclusion de Azul tripán y Observación de cambios morfológicos celulares**

Las células RKO se cultivaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células / ml en placas de cultivo de 60 mm. Después de 24 h, las células fueron tratadas con o sin diversas dosis de **2** por 24 h. Después del tratamiento, las células se visualizaron bajo un microscopio de contraste de fase invertida (Nikon) para observar los cambios morfológicos celulares producidos por el tratamiento, y se tomaron fotografías. Después del periodo de tratamiento, tanto las células adherentes como las flotantes se cosecharon y se lavaron con PBS, y los sedimentos celulares se resuspendieron en medio y se incubaron durante 5 min en 0,4% de azul tripano (Sigma), las células viables se contaron usando un hemocitómetro. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron 3 veces.

#### **5.5.3.2. Índice Mitótico y de replicación**

Se trato durante 48 h las celulas RKO con **2** y el medio también se complementó con BrdU (3,24 M) para determinar los indices mitotico y de replicación, a las 48 h de cultivo, se añadió colcemid (0,13 g/mL) para la inhibición de la citocinesis. Una vez pasadas 72 h de cultivo las celulas se incubaron durante 30 min (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) en solución hipotónica (0,075 M KCl) para romper las membranas celulares. Después de la fijación (metanol / ácido acético 3:1) las células se dejaron caer sobre un portaobjetos y se tiñeron



de acuerdo con el método de fluorescencia más Giemsa para diferenciar las cromátidas hermanas (Perry, P.; Wolff, 1974). Se realizó un análisis microscópico para determinar el índice mitótico (IM) anotando el número de metafases en 2000 células. La proporción de primera (M1), segunda (M2) y tercera o más (M3) divisiones mitóticas en 100-200 metafases se evaluó para determinar el índice de replicación (IR) de acuerdo con la ecuación (3) (Rojas, et al., 1993)

$$RI = \frac{M1 + 2M2 + 3M3}{\text{Metafases totales analizadas}} \quad (3)$$

### 5.5.3.3. Análisis del ciclo celular

La distribución del ciclo celular se evaluó mediante tinción con yoduro de propidio (PI). Las células RKO se sembraron en placas de 60 mm de cultivo (1 x 10<sup>6</sup> células) y se dejó 24 h para la fijación. Las células se trataron entonces con o sin **2** (5-100 mM) por 24 y 48 h; y se trató a la CI<sub>50</sub> de cada derivado **2a-2l** por 24 h. Las células se recogieron, se lavaron con PBS, los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µL de PBS y se fijaron con etanol absoluto y se almacenaron a -20 °C durante 24 h. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS, y los sedimentos celulares se incubaron a continuación en un tampón que contiene 50 mg / ml de PI, 0.1% de citrato de sodio, 0,1% Triton-X-100, y 100 mg / ml ARNasa durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, el porcentaje de células en las fases del ciclo celular G1, S, y G2/M se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II. Los datos fueron adquiridos y analizados utilizando software DIVA (Becton

Dickinson). La integración del área bajo la curva para cada una de las fases del histograma se realizó con el software ModFit LT.

Como control negativo se utilizó etanol al 0,1% por cuanto los derivados de Argentatina B a probar se disolvieron a una concentración máxima de 0,1% (v/v) del mismo.

Como control positivo se usó Doxorubicina 1 $\mu$ M, un quimioterapéutico utilizado comúnmente en el tratamiento de muchos tipos de cáncer incluido cáncer de colon (Park et al., 2012). Se ha reportado que se puede emplear este compuesto tanto en estudios citotóxicos como citostáticos a dosis comprendidas entre 0,1  $\mu$ M a 8  $\mu$ M en varias líneas tumorales siendo 1 $\mu$ M para las células de cáncer de colon RKO una concentración cercana a la CI<sub>50</sub> de la molécula (Sadeghi-Aliabadi et al., 2010; Park et al., 2012). Se conoce adicionalmente que la Doxorubicina ocasiona tanto muerte celular por apoptosis como arresto en la fase G2 del ciclo celular (Park et al., 2012).

#### **5.5.3.4. Análisis estadístico**

Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  EEM de los experimentos realizados independientemente, como se indica en cada figura. La significación estadística se obtuvo con el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Dunnet post-test, los cultivos tratados se compararon con los observados en el control de etanol (GraphPad Prism 4)  $p = 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **5.6. Estudios *in silico***

Para los estudios de simulación se utilizó el método docking automatizado implementado en MOE 2012.101 utilizando el campo de fuerza MMFF94s. La estructura del cristal de la COX-2 seleccionada para este estudio fue PDB-ID:1CX2 co-cristalizada con SC-558, que es un inhibidor selectivo de la COX-2; \_ENREF\_9 ligando ocupa el sitio activo de la COX-2. Para tener en cuenta, al menos parcialmente, para la flexibilidad de proteínas, el acoplamiento rígido fue seguido por ajuste inducido de acoplamiento, con la configuración predeterminada.

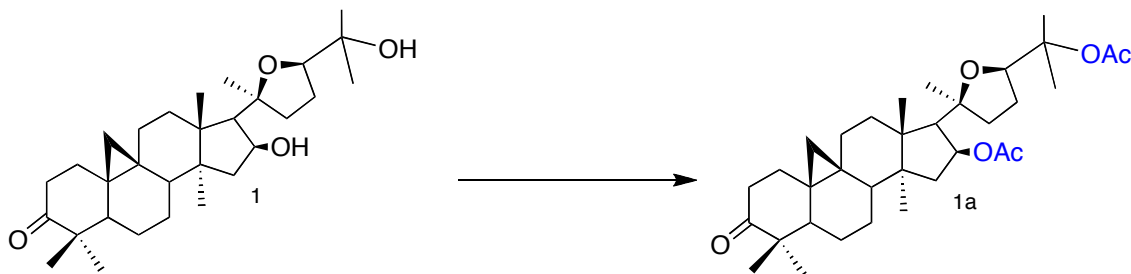
## **5.7. TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LAS ARGENTATINAS A y B**

A partir de las argentatinas A (**1**) y B (**2**) se obtuvieron 20 derivados **1a-1h** y **2a-2i**.

Las transformaciones correspondientes se describen a continuación.

## 5.7.1. ARGENTATINA A

### 5.7.1.1. 16,25-diacetil-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxicicloartan-3-ona [1a].

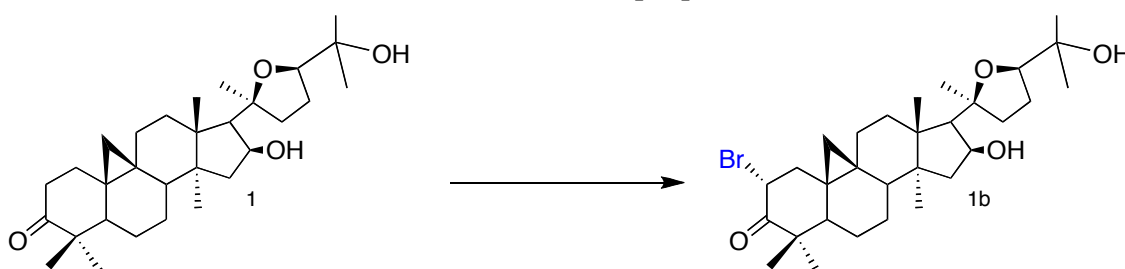


**Figura 13.** Obtención de la 16, 25-diacetil-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxicicloart-3-ona [1a].

Una mezcla de 25.5 mg de **1**, 21 mg de acetato de sodio y 2 ml de anhídrido acético se calentó a reflujo por una hora. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en un matraz Erlenmeyer que contenía 5 g de hielo, se agitó por 3 minutos y se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se secó y concentró a presión reducida para obtener un sólido impuro. La purificación del producto de reacción se logró mediante re cristalizaciones sucesivas (Hex/AcOEt) para obtener 27.4 mg del 16,25-diacetil-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-3-ona [1a]. p.f. 158-160 °C. IR (Película)  $\text{cm}^{-1}$ : 1727 (C=O), 1701 (C=O). E.M. m/z (%): 556 ( $\text{M}^+$ ); M-60 (496; 37.0); M-59 (3.08); M-58 (498;1.5); 185 (58.68); 143 (33.97); 125 (100); 85 (10.03); 59 (3.08); 58 (0.77); 43 (44.01). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  ppm: 0.58 (d, J=5.6 Hz, 1H, H-19), 0.84 (d, J=5.6 Hz,1H), 0.95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.04 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.22 (s,3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.54 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.0 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.75 (t, J=7.76 Hz, 1H, H-24), 5.41 (m,1H, H-16). RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 33.22 (C-1), 37.37 (C-2), 216.2 (C-3), 50.13 (C4), 47.7 (C-5), 21.2 (C-6), 26.2 (C-7), 48.35 (C-8), 22.13 (C-9), 26.43 (C-10), 26.72 (C-11), 32.04 (C-12), 46.5 (C-13)

46.99 (C-14), 45.45 (C-15), 75.04 (C 16), 57.0 (C-17), 20.75 (C-18), 30.39 (C-19), 85.05 (C-20), 22.91 (C-21), 34.93 (C-22), 25.63 (C-23), 81.68 (C-24), 82.28 (C-25), 28.68 (C-26), 22.68 (C-27), 19.90 (C-28), 21.57 (C29), 20.08 (C-30), 170.44, 170.30, 22.13 y 22.68 (metilo de los grupos acetato), 170.4 y 170.3 (carbonilo de los grupos acetato).

**5.7.1.2. 2 $\alpha$ -Bromo-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,2-dihidroxicicloartan-3-ona [1b].**

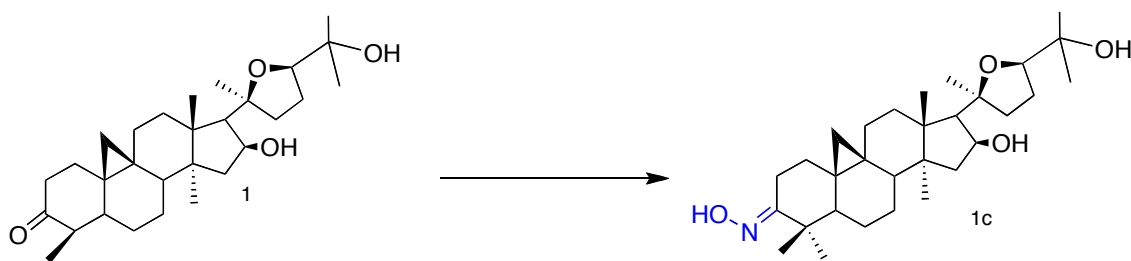


**Figura 14.** Obtención de la 2 $\alpha$ -Bromo-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1b].

100 mg de argentatina A (**1**) se disolvieron en 5 ml de ácido acético glacial y se hicieron reaccionar con 0.4 ml de una disolución 1M de bromo en ácido acético. La reacción se llevó a cabo en agitación a 3 °C. Después de 90 minutos, la mezcla de reacción se vertió en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 g de hielo. Se observó la presencia de un precipitado abundante de color amarillo, el cual se lavó con una disolución 5% NaHCO<sub>3</sub> y, posteriormente, se recristalizó para obtener el producto **1b**, p. f. 116-118°C. IR (película)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3380.48 (O-H), 2972.39-2872.9 (C-H), 1721.94 (C=O), 1463.42, 1382.14. EM-IE m/z (%): 550 (M<sup>+</sup>, 0.77), 498 (15), 496 (15), 351 (5), 349 (5), 143 (100), 125 (30), 107 (31), 81 (20), 71 (32), 43 (30). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.60 (d, *J*=4.3, 1H, H-19), 0.73 (d, *J*=4.3, 1H, H-19'), 0.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (s, 3H,

CH<sub>3</sub>), 1.16 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.70 (sa, 2H, 2 O-H), 3.86 (t, *J* = 7.7, 1H, H-24), 4.63 (m, 1H, H-16), 5.11 (dd, *J* = 6.5, *J* = 12.8, 1H, H-2β). RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 32.9 (C-1), 37.6 (C-2), 201.4 (C-3), 50.9 (C-4), 47.7 (C-5), 21.01 (C-6), 25.6 (C-7), 43.5 (C-8), 20.8 (C-9), 25.9 (C-10), 26.6 (C-11), 31.8 (C-12), 46.2 (C-13), 46.5 (C-14), 48.3 (C-15), 73.2 (C-16), 55.4 (C-17), 21.6 (C-18), 30.2 (C-19), 87.0 (C-20), 21.1 (C-21), 37.3 (C-22), 27.3 (C-23), 84.5 (C-24), 70.9 (C-25), 27.3 (C-26), 26.1 (C-27), 20.4 (C-28), 20.7 (C-29), 21.0 (C-30).

### 5.7.1.3. 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1c]

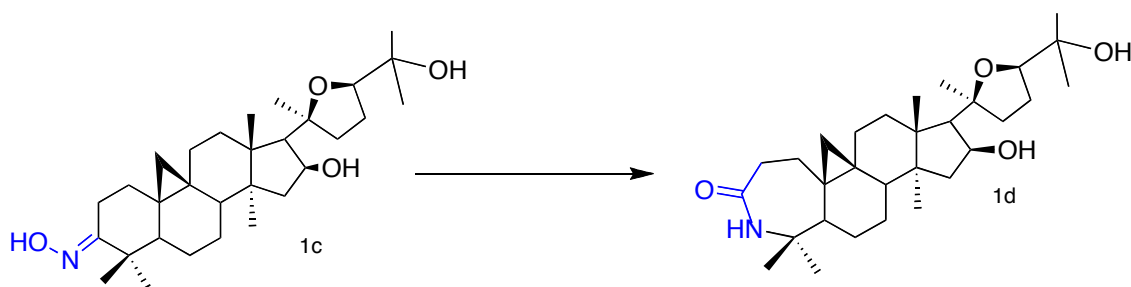


**Figura 15.** Obtención de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1c]

Una solución de 301 mg de argentatina A [1] en 4.5 ml de piridina se trató con 99 mg of NH<sub>2</sub>OH.HCl. La mezcla de reacción se agitó y calentó a reflujo durante una hora. Posteriormente, la mezcla se vertió en un matraz que contenía 100 g de hielo y extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó en repetidas ocasiones con una disolución de HCl al 10% seguido de agua y posteriormente se secó y concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por medio de recristalizaciones sucesivas por par de disolventes

(Hex/AcOEt), para obtener 277 mg de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [**1c**]. p. f. 200-205°C. IR (KBr)  $\nu_{\max}^{-1}$ : 3379.8, 2968.9, 2870.9, 1638.5, 1460, 1380.1, 1103.9. EM-IE m/z (%): 487 (M<sup>+</sup>,13), 470 (9), 452 (9), 286 (8), 143 (100), 125 (21), 59 (10). RMN 1H (300 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.54 (d, *J*=4.2, 1H, H-19), 0.74 (d, *J*=4.2, 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H,CH<sub>3</sub>), 1.1 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.3 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.3 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.4 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.38 (dc, 1H), 3.9 (t, *J*= 1.8, *J*= 7.8, 1H, H-24), 4.6 (m, 1H, H-16). RMN 13C (75.4 MHz)  $\delta$  ppm: 32.7 (C-1), 20.0 (C-2), 167.1 (C-3), 43.4 (C-4), 48.8 (C-5), 21.7 (C-6), 26.1 (C-7), 47.6 (C-8), 20.9 (C-9), 27.3 (C-10), 26.1 (C-11), 33.1 (C-12), 46.3 (C-13), 46.6 (C-14), 48.7 (C-15), 73.4 (C-16), 55.6 (C-17), 21.2 (C-18), 30 (C-19), 87.2 (C-20), 25.7 (C-21), 37.3 (C-22), 23.7 (C-23), 84.5 (C-24), 70.8 (C-25), 27.3 (C-26), 26.3 (C-27), 20.3 (C-28), 20.9 (C-29), 20.9 (C-30).

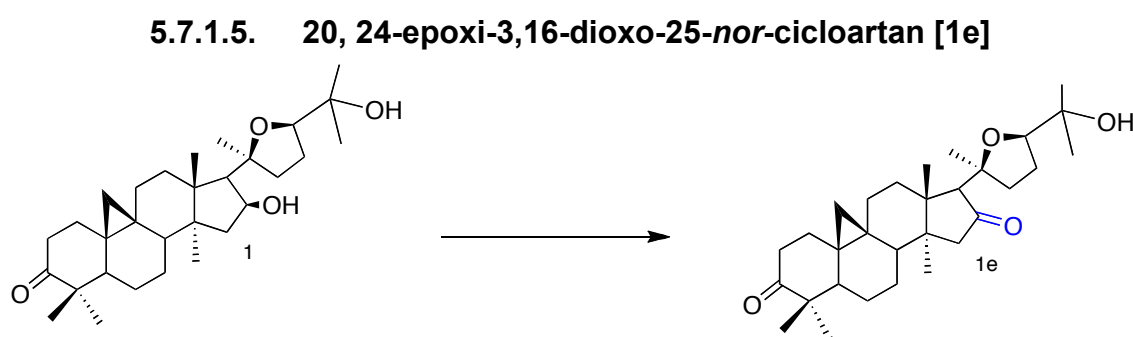
#### 5.7.1.4. 4-Aza-20,24-epoxy-16, 25-dihydroxy-cycloartan [**1d**]



**Figura 16.** Obtención de la 4-Aza-20, 24-epoxy-16, 25-dihydroxy-cycloartan [**1d**]

A 100 mg de oxima de argentatina A **1c** disueltos en CHCl<sub>3</sub> se le adicionaron 0.5 mL de anhídrido trifluoroacético lentamente a 0°C. Concluida la adición se mantuvo la mezcla de reacción con agitación constante a 25°C durante 18 min. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida. De esta reacción se

obtuvo un producto identificado como 16-trifluoroacetoxi-lactama de argentinina A. A dicho producto se le adicionó una solución de carbonato de potasio en metanol y se mantuvo con agitación durante 15 min. a temperatura ambiente, posteriormente la solución se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna con polaridad de 2:1 Hex:AcOEt, obteniendo 38 mg de 4-Aza-20, 24-epoxy-16, 25-dihydroxy-cycloartan [**1d**]. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3612, 3395, 2963, 2871, 1644 cm<sup>-1</sup>. EIMS m/z (%): 487 (M<sup>+</sup>, 29.27), 429 (M<sup>+</sup> -58, 5.4), 428 (11.5), 413 (64.86), 58 (100). HRMS: encontrado m/z 488.3726, [M+H]<sup>+</sup>; C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>4</sub> requerido 488.3739. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): d 0.61 (1H, d, J = 6 Hz, H-19), 0.68 (1H, d, J = 6 Hz, H-19), 0.86 (3H, s, H-29/30)\*, 1.11 (3H, s, H-18), 1.21 (3H, s, H-21), 1.26 (3H, s, H-27), 1.30 (3H, s, H-26), 1.33 (3H, s, H-29/30)\*, 3.1 (1H, m, H-2), 3.83 (1H, t, J = 7 Hz, H-24), 4.60 (1H, m, H-16), 7.5 (1H, s, NH). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): d 20.2 (C-18), 20.3 (C-28), 21.0 (C-6), 21.0 (C-9), 22.1 (C-29), 23.9 (C-23), 24.4 (C-30), 25.3 (C-21), 26.5 (C-7), 26.5 (C-10), 26.7 (C-11), 27.0 (C-26), 27.5 (C-27), 29.5 (C-1), 29.9 (C-2), 30.8 (C-19), 33.0 (C-12), 36.2 (C-22), 45.5 (C-14), 45.9 (C-13), 48.2 (C-5), 48.5 (C-8), 50.08 (C-15), 55.5 (C-4), 56.3 (C-17), 69.4 (C-25), 71.5 (C-16), 83.4 (C-24), 85.6 (C-20), 175.6 (C-3).

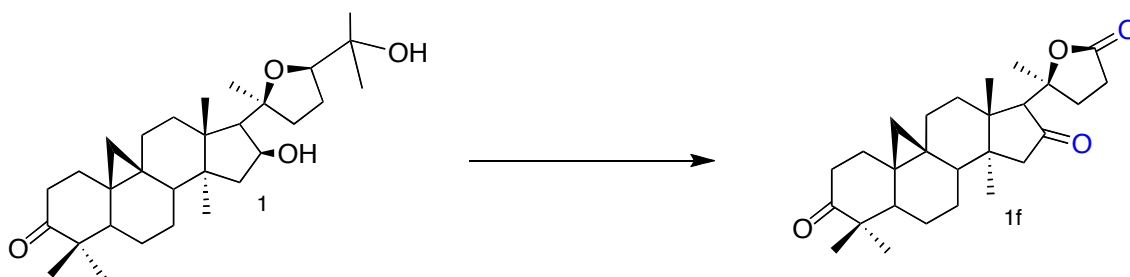


**Figura 17.** Obtención de la 20, 24-epoxi-3,16-dioxo-25-nor-cicloartan [**1e**]



200 mg de **1** fueron tratados con 170 mg ácido m-cloroperoxibenzoico durante 3 horas, para obtener 180 mg de un sólido blanco identificado como 20, 24-epoxi-3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan [**1e**].

**5.7.1.6. 3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan-20, 24-lactona [**1f**]**

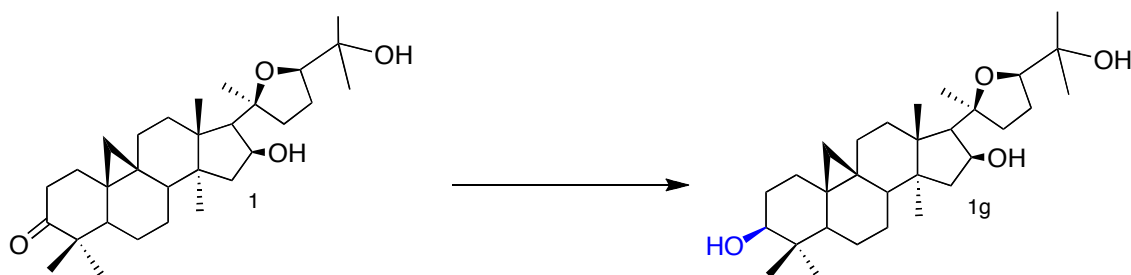


**Figura 18.** Obtención de la 3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan-20,24-lactona [**1f**]

Una disolución de 100 mg de argentatina A [**1**] en 4 ml de ácido acético se trató a 0-5 °C con una disolución acuosa de trióxido de cromo preparada con 100 mg de CrO<sub>3</sub> en 0.3 ml de agua. Después de 1 hora, la mezcla se dejó a temperatura ambiente y posteriormente se extrajo con AcOEt (3x). La fase orgánica se procesó de manera usual para obtener la 3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan-20,24-lactona [**1f**]. p. f. 138-140 °C. IR (Película)  $\nu_{\max}^{-1}$  cm<sup>-1</sup>: 2972.73 2876.01, 1768.64 (C=O), 1737.46 (C=O), 1703.84 (C=O), 1462.38, 1385.8. EM-IE m/z (%): 426 (M<sup>+</sup>, 100), 411 (23), 313 (35), 288 (34), 270 (15), (42), 43 (27). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.68 (d, *J*= 4.5, 1H, H-19), 0.88 (d, *J*= 4.5, 1H, H-19'), 1.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz)  $\delta$  ppm: 33.1 (C-1), 37.3 (C-2), 215.1 (C-3), 50.1 (C-4), 48.5 (C-5), 21.2 (C-6), 26.2 (C-7), 47.0 (C-8), 20.2 (C-9), 26.5 (C-10), 26.1 (C-11), 33.4 (C-12), 45.7 (C-13), 46.2 (C-14), 50.6 (C-15), 215.8 (C-16), 65.1 (C-17), 28.3 (C-18), 30.1 (C-19), 85.5 (C-20), 22.1

(C-21), 42.4 (C-22), 27.8 (C-23), 177.2 (C-24), 19.7 (C-28), 20.7 (C-29), 19.9 (C-30).

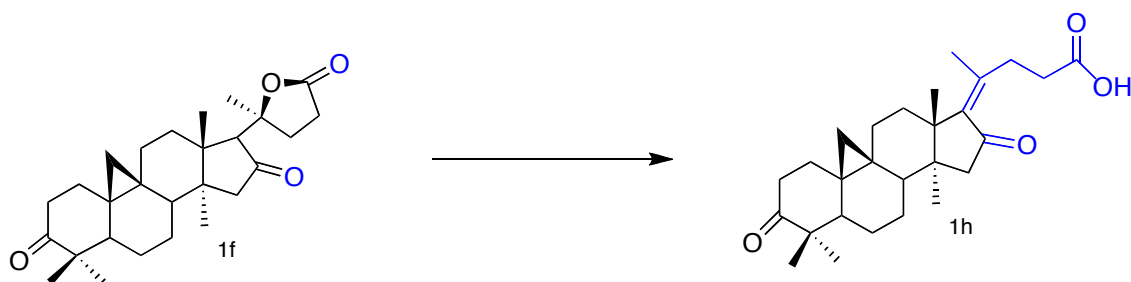
**5.7.1.7. 3-hidroxi (16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1g]**



**Figura 19.** Obtención de la 3-hidroxi (16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1g]

A 100 mg de argentatina A [1] se los trató con 80 mg borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) obteniéndose un sólido blanco identificado como 3-hidroxi (16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan [1g], con punto de fusión de 125-128 °C y peso molecular de 474 g/mol.

**5.7.1.8. 3,16-dioxo-25-nor-cycloart-17-en-24-oic acido [1h]**



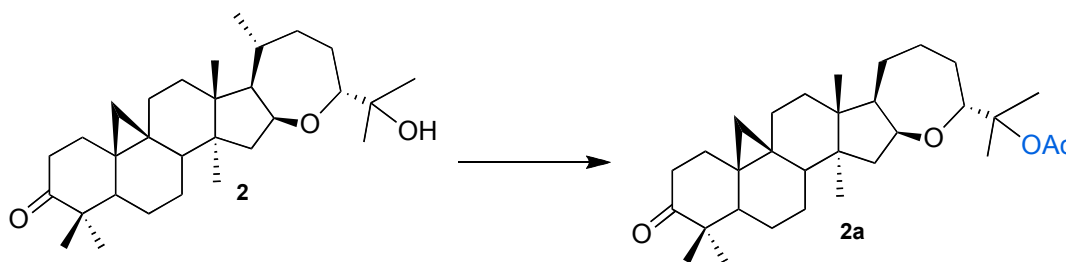
**Figura 20.** Obtención de la 3,16-dioxo-25-nor-cycloart-17-en-24-oic acido [1h]

Una solución de 100 mg de 1f en EtOH se mantuvo a reflujo con 289 mg de hidróxido de potasio por 40 min. Después la reacción fue neutralizada y se

obtuvo 70 mg de 3,16-dioxo-25-nor-cicloartan-17-en-24-oic acido [**1h**]. p.f. 182–184 °C. IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3327, 1741, 1703, 1615  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS m/z (%): 426 ( $\text{M}^+$ , 39.69), 411 (100), 143 (4.5), 125 (3). HRMS: encontrado m/z 427.2864,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{O}_4$  requerido 427.2848.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm: 0.64 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, H-19), 0.86 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, H-190), 0.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.35 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm: 20.2 (C-18), 20.7 (C-28), 20.8 (C-30), 20.9 (C-9), 21.2 (C-29), 22.1 (C-21), 22.6 (C-6), 26.0 (C-7), 26.3 (C-11), 26.3 (C-10), 29.2 (C-23), 30.6 (C-19), 30.8 (C-22), 32.6 (C-12), 33.1 (C-1), 37.2 (C-2), 42.3 (C-13), 45.7 (C-14), 47.9 (C-8), 48.2 (C-5), 50.20 (C-4), 51.0 (C-15), 141.7 (C-17), 149.5 (C-20), 177.8 (C-24), 207.3 (C-16), 216.0 (C-3).

## 5.7.2. ARGENTATINA B

### 5.7.2.1. 25-O-acetil-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2a**]

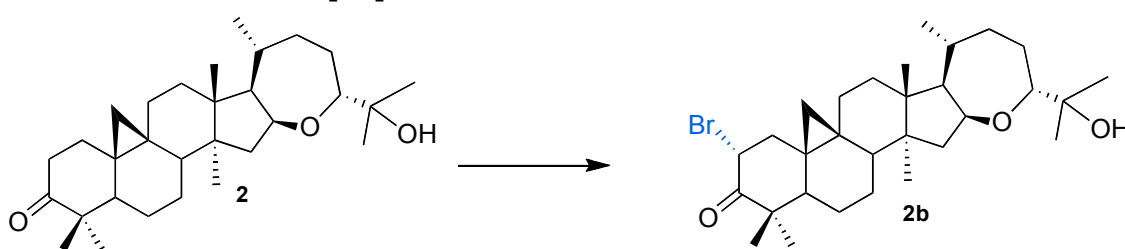


**Figura 21.** Obtención de 25-O-acetil-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan -3-ona [**2a**]

Una mezcla de 500 mg (1.09 mmol) de argentatina B (**2**), 256 mg de acetato de sodio y 6 ml de anhídrido acético, se calentó a temperatura de reflujo por 5 horas, posteriormente se vertió sobre un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo y se agitó por 15 minutos, se formó un precipitado que se disolvió en

AcOEt, la fase orgánica se evaporó a presión reducida para obtener un producto de color café que se recristalizó con hexano/AcOEt obteniéndose 417 mg de 25-O-acetil-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a]. p.f. 152-154 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2944, 2872, 1734 (C=O), 1707 (C=O), 1464, 1370, 1254, 1115. p. f. 164 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 2944.8, 2872.1, 1734.3 (C=O), 1707.6 (C=O), 1464, 1370, 1254.5, 1115.0. EM-IE m/z,(%): 498 (1.5), 440, 438, 397 (100), 143, 85. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  ppm: 0.57 (d,  $J= 4.4$ , 1H, H-19), 0.82 (d,  $J= 4.4$ , 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.93 (d,  $J= 6.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3$ -21), 1.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.44 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.30 (ddd,  $J= 2.70$ ,  $J= 4.3$ ,  $J= 14.03$ , 1H), 2.72 (td,  $J= 6.6$ ,  $J= 13.8$ , 1H), 3.83 (dd,  $J= 2.2$ ,  $J= 12.3$ , 1H, H-24), 4.62 (c, 1H, H-16).

#### 5.7.2.2. 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2b]

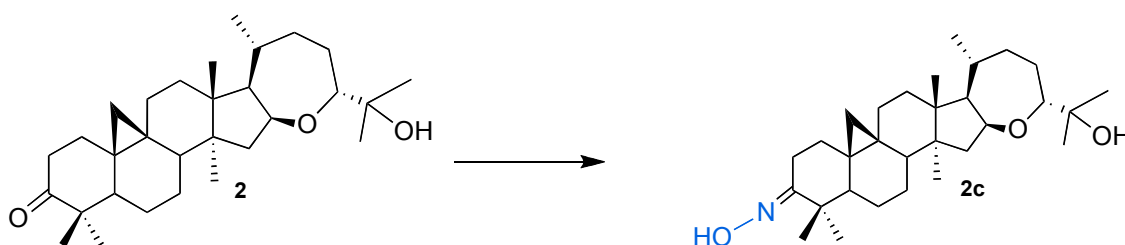


**Figura 22.** Obtención de la 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2b]

Se disolvieron 200.4 mg de argentatina B (2) (0.44 mmol) en 5 ml de ácido acético glacial y se hicieron reaccionar con 0.44 ml de una disolución 1M de bromo en ácido acético glacial. La reacción se llevo a cabo en agitación a 5 °C,

después de 75 minutos la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlemmeyer que contenía 35 gramos de hielo. Se observó un precipitado blanco abundante, el cual se lavó con una solución al 10% de NaHCO<sub>3</sub>, se disolvió en AcOEt y se seco sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, luego se recristalizó con hexano/AcOEt, la purificación del producto se realizó via cromatografía en columna empacada con gel de sílice y eluida con una mezcla hexano:AcOEt de polaridad creciente. De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (93:7) se obtuvieron 151.2 mg (64.3%) de 2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2b**], de p. f. 203-205 °C. IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3338.93 (O-H), 2977.18 - 2874.74 (C-H), 1720.5 (C=O), 1464.44, 1384.73. EM-IE m/z (%): 534 (M<sup>+</sup>, 4), 519 (M<sup>+</sup> -15, 2.7), 476 (M<sup>+</sup> -58, 26), 475 (M<sup>+</sup> -59, 47.9), 175 (100), 143 (15.6), 85 (95.2), 59 (76.02). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0.71 (d, J=4.8, 1H, H-19), 0.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94 (d, J= 6.6, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.09 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.15 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 2.80 (sa, 1H, O-H), 3.59 (dd, J= 2.2, J= 11.3, 1H, H-24), 4.60 (c, 1H, H-16), 5.11 (dd, J=6.6, J=12.8, 1H, H-2β). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz) δ ppm: 33.3 (C-1), 46.0 (C-2), 205.7 (C-3), 55.0 (C-4), 48.4 (C-5), 21.2 (C-6), 20.9 (C-7), 47.4 (C-8), 21.3 (C-9), 26.19 (C-10), 26.4 (C-11), 32.4 (C-12), 45.9 (C-13), 47.5 (C-14), 44.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 18.7 (C-18), 29.2 (C-19), 29.2 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.2 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 19.5 (C-28), 23.0 (C-29), 20.8 (C-30).

### 5.7.2.3. 3-oxima-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2c]

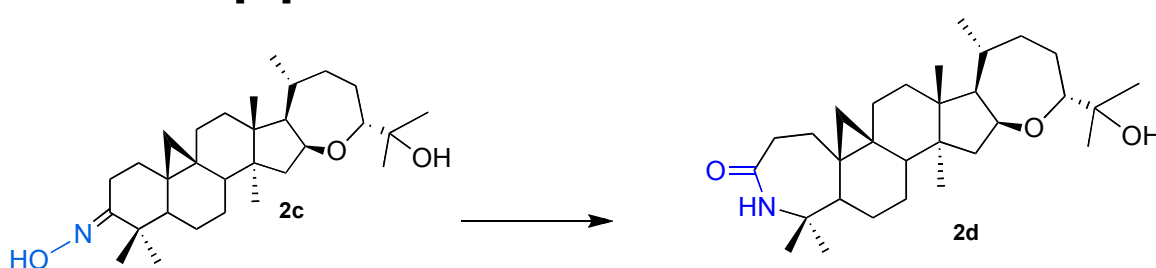


**Figura 23.** Obtención de la 3-oxima-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2c]

Se disolvieron 102.1 mg de argentatina B (**2**) (0.22 mmol) en 1.5 ml de piridina y se hicieron reaccionar con 0.28 mg de clorhidrato de hidroxilamina (0.40 mmol), la reacción se llevo a cabo en agitación a temperatura de reflujo por 1 hora, luego la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlemmeyer que contenía 50 gramos de hielo. Se observó un precipitado blanco abundante, el mismo que se filtró, posteriormente se disolvió en AcOEt, se lavo con HCl al 10% y agua, la fase orgánica se seco con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida, luego se recrystalizó con hexano/AcOEt, para obtener 98.8 mg de la 3-oxima-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2c]. p.f. 223-225 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3498, 3386 (O-H), 2958, 2927 (C-H) 1737, 1460, 1378, 1115, 1058, 929. EM-IE m/z (%): 471 (M<sup>+</sup>, 78), 454 (65), 413 (M<sup>+</sup>-58, 40), 412 (90), 396 (50), 107 (38), 59 (100). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.50 (d, *J*=4.5, 1H, H-19), 0.72 (d, *J*=4.5, 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, *J*= 6.3, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.09 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.11

(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.36 (dc, 1H), 3.59 (dd, *J* = 1.8, *J* = 12.5, 1H, H-24), 4.59 (c, 1H, H-16). RMN <sup>13</sup>C (75.4 MHz) δ ppm: 32.7 (C-1), 35.5 (C-2), 168.9 (C-3), 45.8 (C-4), 48.8 (C-5), 21.2 (C-6), 26.1 (C-7), 47.2 (C-8), 20.9 (C-9), 25.6 (C-10), 26.3 (C-11), 32.7 (C-12), 44.8 (C-13), 42.9 (C-14), 45.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19), 29.0 (C-20), 20.7 (C-21), 35.5 (C-22), 23.4 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.8 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 20.5 (C-30).

**5.7.2.4. 4-Aza-(16β,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d]**

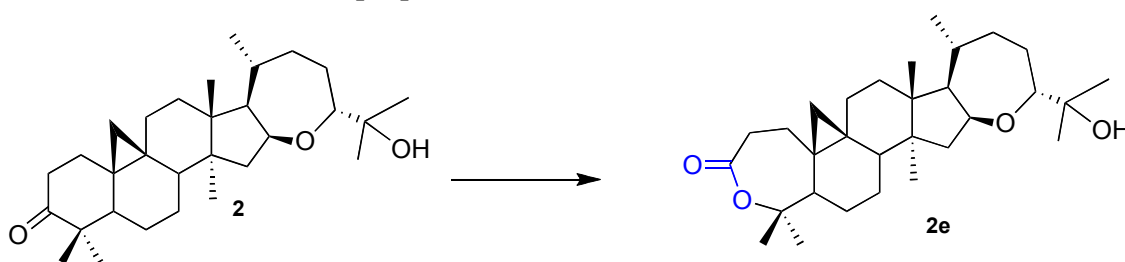


**Figura 24.** Obtención de la 4-aza-(16β,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d].

Una disolución de 70 mg de la 3-oxima-(16β,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2c**] en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0°C en agitación, se trató con 1 ml de anhídrido trifluoroacético, durante 1 hora. Después, se adicionaron 10 ml de agua. La fase orgánica se separó y se lavó con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 5% (3 x 20 ml) y posteriormente con agua (3 x 20 ml). A partir de la fase orgánica se aisló un sólido, el cual se purificó por medio de cromatografía en columna (MeOH). Finalmente, se obtuvieron 38.7 mg de la 4-aza-(16β,24*R*)

16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan [**2d**], p. f. 190-193°C. IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3405.1 (O-H), 2963 (C-H), 2871.3, 1650 (CO), 1455.9, 1376.3 (C-N), 1113.0. EM-IE m/z (%): 471 (M<sup>+</sup>, 22), 413 (M<sup>+</sup> -58, 15), 412 (40), 58 (100). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.60 (d, *J*=4.9, 1H, H-19), 0.67 (d, *J*=4.9, 1H, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, *J*= 6.5, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.09 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.56 (m, 2H, CH, OH), 3.59 (dd, *J*= 2.14, *J*= 12.2, 1H, H-24), 4.61 (c, 1H, 39-16), 6.43 (NH). RMN<sup>13</sup>C (50 MHz)  $\delta$  ppm: 30.4 (C-1), 35.4 (C-2), 177.6 (C-3), 57.3 (C-4), 50.3 (C-5), 23.5 (C-6), 25.5 (C-7), 48.5 (C-8), 23.0 (C-9), 28.1 (C-10), 26.9 (C-11), 32.9 (C-12), 45.9 (C-13), 45.3 (C-14), 45.1 (C-15), 75.0 (C-16), 57.5 (C-17), 19.1 (C-18), 29.9 (C-19), 28.9 (C-20), 20.9 (C-21), 35.2 (C-22), 25.5 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.7 (C-27), 19.7 (C-28), 31.8 (C-29), 24.3 (C-30).

**5.7.2.5. (16 $\beta$ , 24R)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3,4-lactona [**2e**]**

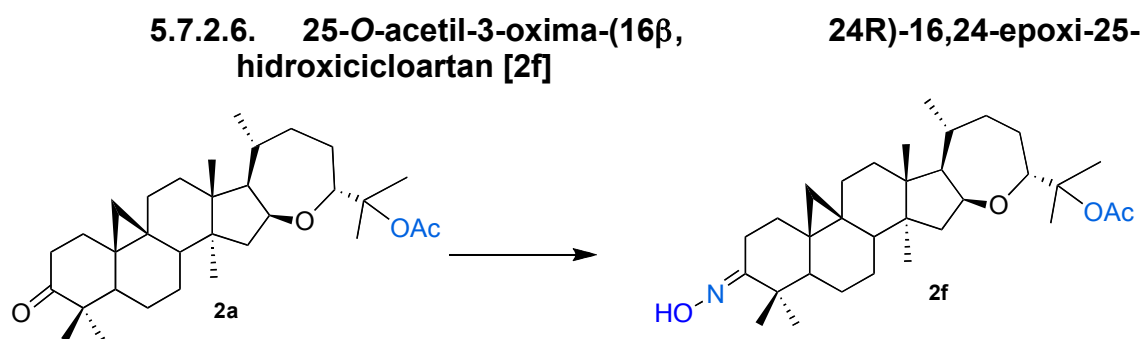


**Figura 25.** Obtención de la (16 $\beta$ ,24R)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3,4-lactona [**2e**]

300 mg de **2** fueron tratados con 174 mg ácido m-cloroperoxibenzoico durante 3 horas, para dar 124 mg de **2e**, p. f. 136–138 °C. [ $\alpha$ ]<sup>589</sup> -36.5° (c 6.8 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu_{\max}$  3502, 2970, 1702 cm<sup>-1</sup>. EIMS m/z (%): 472 (M<sup>+</sup>, 9.8), 414 (M<sup>+</sup> -58, 15), 413 (100), 143 (16.2), 55 (33). HRMS: encontrado m/z



473.3615 [M+H]<sup>+</sup>; C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>4</sub> requerido 473.3630. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0.50 (d, J = 4.4, 1H, H-19), 0.66 (d, J = 4.9, 1H, H-190), 0.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.05 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-30), 2.70 (m, 2H), 2.17 (s, OH), 3.60 (bd, J = 11.4, 1H, H-24), 4.60 (q, 1H, H-16). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 18.9 (C-18), 19.6 (C-28), 20.8 (C-21), 27.3 (C-10), 22.7 (C-9), 22.9 (C-29), 23.3 (C-23), 23.8 (C-26), 24.9 (C-1), 25.3 (C-6), 25.7 (C-2), 25.8 (C-27), 26.7 (C-11), 26.7 (C-7), 28.8 (C-20), 29.6 (C-19), 30.9 (C-30), 32.6 (C-12), 35.3 (C-22), 44.9 (C-15), 45.0 (C-14), 45.2 (C-13), 48.2 (C-8), 49.7 (C-5), 57.0 (C-17), 73.1 (C-25), 74.9 (C-16), 87.1 (C-4), 82.4 (C-24), 175.4 (C-3).

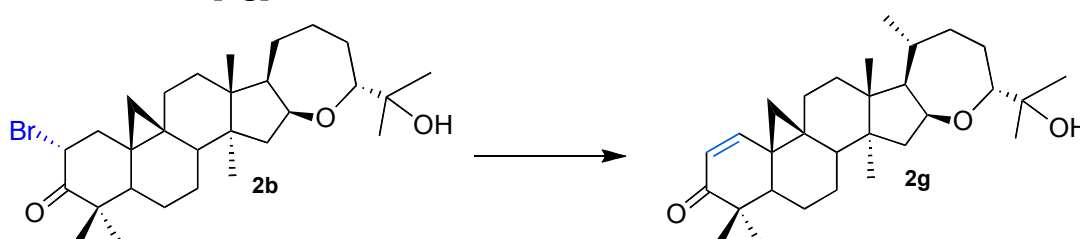


**Figura 26.** Obtención la 25-O-acetil-3-oxima-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan [2f]

100.2 mg (0.204 mmol) de 25-O-acetil-(16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a], disueltos en 1.5 ml piridina, se hicieron reaccionar con 28.9 mg de clorhidrato de hidroxilamina a temperatura de reflujo por 1.5 horas, luego la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlemmeyer que contenía 50 gramos de hielo. Se observó un precipitado, se filtró y se disolvió en AcOEt, se lavo con HCl al 10% y agua, la fase orgánica se seco con sulfato

de sodio anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida, luego se recristalizó con hexano/AcOEt, para obtener 78.8 mg (86.1%) de la 25-O-acetil-3-oxima-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan (**2f**). p.f. 208-210 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3319.1 (O-H), 2950.3-2874.8 (C-H), 1734.8 (C=O), 1654, 1459.3, 1371.6, 1255.2, 1115.7, 934.5. EM-IE m/z (%): 513 (M+, 16), 454 (65), 497 (12), 496 (11), 453 (69), 436 (100), 412 (92), 396 (36), 109 (33), 59 (15), 43 (63). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.49 (d, *J*=4.4, 1H, H-19), 0.72 (d, *J*=4.4, 1H, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.92 (d, *J*= 6.5, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub> del grupo acetato), 3.37 (dc, 1H), 3.82 (dd, *J*= 2.0, *J*= 12.3, 1H, H-24), 4.61 (c, 1H, H-16). RMN <sup>13</sup>C (75.4 MHz)  $\delta$  ppm: 32.6 (C-1), 20.8 (C-2), 169.2 (C-3), 43.0 (C-4), 48.7 (C-5), 21.2 (C-6), 25.7 (C-7), 47.1 (C-8), 20.8 (C-9), 26.3 (C-10), 26.1 (C-11), 32.7 (C-12), 45.7(C-13), 45.6 (C-14), 44.7 (C-15), 74.4 (C-16), 57.2 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19), 29.0 (C-20), 21.1 (C-21), 35.3 (C-22), 22.3 (C-23), 80.2 (C-24), 85.0 (C-25), 23.5 (C-26), 23.3 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 21.4 (C-30), 170.3 y 22.5 (C=O y metilo del grupo acetato).

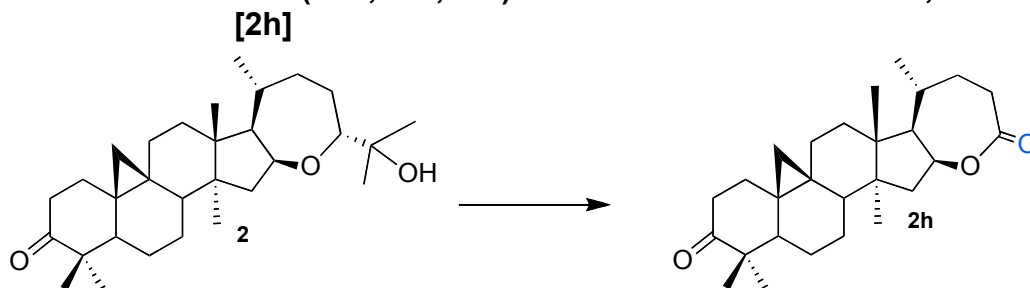
**5.7.2.7. (16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona [2g]**



**Figura 27.** Obtención de la (16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona [2g]

A una suspensión en ebullición de carbonato de calcio (106.55 mg) en diacetamida (5 ml) se colocaron 124.1 mg de 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2b**]. La mezcla se dejó reaccionar por 1 hora en reflujo y agitación constante, posteriormente se dejó enfriar y se agregó 7,5 ml de ácido clorhídrico al 10% y el sólido formado se filtró. La purificación del compuesto se realizó por recristalización con Hexano/AcOEt, se obtuvieron 91.7 mg de (16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona [**2g**] como un sólido cristalino. IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3684.26 (O-H), 3050, 2976.92-2876.12 (C-H), 1663.29 (C=O), 1603, 1521.87, 1473.46, 1424.45, 1334, 1112. EM-IE m/z (%): 454 (M<sup>+</sup>, 27), 436 (M<sup>+</sup>-18, 24), 396 (M<sup>+</sup>-58, 60), 377 (35), 233 (38), 203 (62), 201 (52), 175, 1.09 (s, 6H, 2C), 1.14 (s, 3H, C (61), 161 (80), 159 (77), 147 (62), 137 (100), 135 (83), 120 (56), 109 (68), 93 (54), 85 (48) 59 (39). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.75 (d, J=4.7, 1H, H-19), 0.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94 (d, J= 6.4, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (d, J=4.7, 1H, H-19'), 2.70 (sa, 1H, O-H), 3.60 (dd, J= 2.0, J= 12.5, 1H, H-24), 4.60 (c, 1H, H-16), 5.95 (d, J= 10.0, 1H, H-2), 6.78 (d, J=10.0, 1H, H-1). RMN <sup>13</sup>C (75.4 MHz)  $\delta$  ppm: 153.68 (C-1), 126.77 (C-2), 205.2 (C-3), 46.3 (C-4), 44.4 (C-5), 19.5 (C-6), 27.40 (C-7), 43.2 (C-8), 24.5 (C-9), 29.9 (C-10), 23.6 (C-11), 32.2 (C-12), 45.9 (C-13), 45.8 (C-14), 43.9 (C-15), 74.6 (C-16), 57.0 (C-17), 17.5 (C-18), 29.3 (C-19), 28.4 (C-20), 21.0 (C-21), 35.5 (C-22), 23.4 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 18.8 (C-28), 21.4 (C-29), 19.1 (C-30).

#### 5.7.2.8. (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona

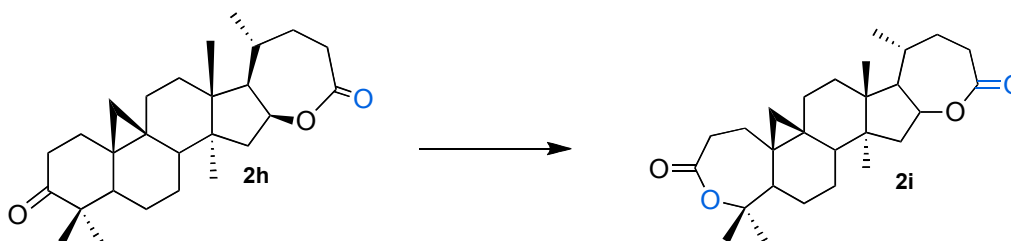


**Figura 28.** Obtención de la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona [2h]

Se disolvieron 400 mg (0.87 mmol) de **2** en 5 ml de ácido acético glacial, se adicionó gota a gota una solución acuosa de CrO<sub>3</sub> (0.131 g de CrO<sub>3</sub> en 0.3 ml de agua) con agitación constante a una temperatura entre 3 y 6 °C. Se mantuvo a esta temperatura por 15 minutos más, y 3 horas a temperatura ambiente. Se adicionó agua con lo que se formó un precipitado que se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se lavó con una solución al 10% de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtro y evaporó para obtener 280 mg de un producto de color amarillo que se recristalizó con diclorometano-hexano, del cual se obtuvo 210.4 mg (58.22%) de la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona [2h]. p. f. 256-258 °C. IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}^{-1}$ : 2964, 1730 (C=O), 1701 (C=O), 1461, 1383, 1325, 1269. EM-IE m/z (%): 412 (95), 398 (20), 397 (70), 311 (45), 274 (100), 259 (43), 133 (55), 121 (47), 119 (45), 105 (48), 93 (47), 91 (46), 55 (60), 41 (45). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.61 (d, J= 4.52, 1H, H-19), 0.85 (d, J= 4.52, 1H, H-19'), 0.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.00 (d, J= 5.5, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.92 (c, 1H, H-16). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz)  $\delta$  ppm: 33.8 (C-1), 37.3 (C-2), 216.2 (C-

3), 50.2 (C-4), 48.3 (C-5), 21.3 (C-6), 26.1 (C-7), 47.4 (C-8), 20.6 (C-9), 26.1 (C-10), 26.2 (C-11), 32.5 (C-12), 46.5 (C-13), 45.7 (C-14), 44.1 (C-15), 80.9 (C-16), 56.3 (C-17), 19.0 (C-18), 29.7 (C-19), 29.3 (C-20), 20.2 (C-21), 31.3 (C-22), 29.3 (C-23), 174.1 (C-24), 19.2 (C-28), 22.2 (C-29), 20.8 (C-30).

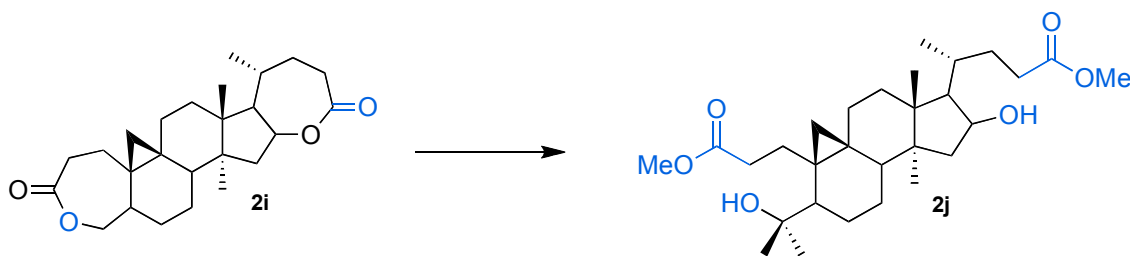
#### 5.7.2.9. (16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona [2i]



**Figura 29.** Obtención de la (16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona [2i]

Se disolvieron 50.3 mg (0.12 mmol) de la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona [2h] en 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se adicionaron 32.13 mg de ácido m-cloro peroxibenzoico y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 48 horas a temperatura ambiente, la fase orgánica se lavó con una solución al 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15ml x 3 veces), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y evaporó y se obtuvo 53.1mg de un sólido amarillento que se recrystalizó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano del cual se obtuvo 48.1 mg (92%) de la (16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona [2i]. p. f. 210-212 °C. IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 1726, 1718 (lactona), 1701 (C=O) EM-IE m/z (%): 428 (8.2), 413 (17.2), 57 (100). RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.65 (d, 1H, H-19), 0.71 (d, 1H, H-19), 0.95 (s, 3H, 25-H), 1.00 (d, 3H, 21-H), 1.16 (s, 3H, 18-H), 1.40 (s, 3H, 27-H), 1.49 (s, 3H, 26-H), 4.92 (dd, 1H, 16-H).

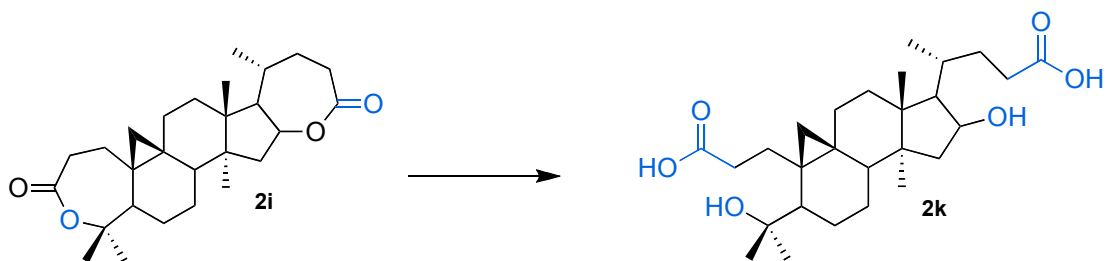
**5.7.2.10. 1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxietyl)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3 carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a] ciclopropa [e]-naftalen-6-ol [2i]**



**Figura 30.** Obtención de la 1a-(2-metoxicarbonietil)-2-(1-metil-1-hidroxietyl)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-metoxicarbonilpropil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a]ciclopropa[e]-naftalen-6-ol [2j]

Se disolvieron 50.1 mg (0.12 mmol) de la (16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona [2i] en 5 ml de MeOH anhidro, se adicionaron 22.75 mg de hidróxido de potasio y la mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante por 40 minutos a temperatura de reflujo, se enfrió la mezcla de reacción y se acidifico con HCl al 10%, la fase orgánica se extrajo con AcOEt (30 ml x 3 veces), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y evaporó y se obtuvo 35.2 mg (61.2%) del compuesto **2j**. p.f. 118-120 °C

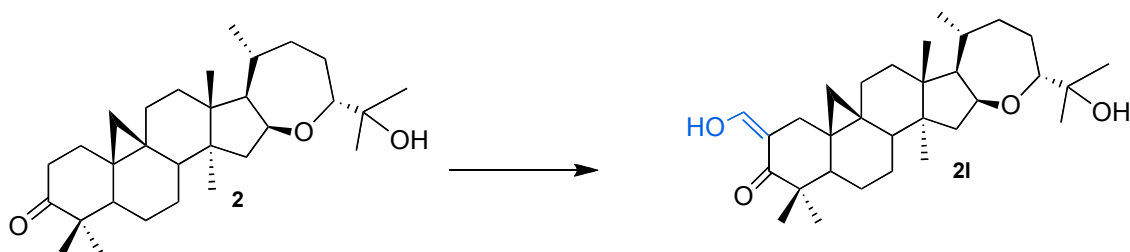
**5.7.2.11. 1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxietyl)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H ciclopenta [a] ciclopropa [e] -naftalen-6-ol [2k]**



**Figura 31.** Obtención de la 1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxietyl)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a]ciclopropa[e]-naftalen-6-ol [**2k**]

Se disolvieron 50.2 mg (0.1171 mmol) de la (16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona [**2i**] en 10 ml de H<sub>2</sub>O, se adicionaron 36.1 mg de hidróxido de potasio y la mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante por 40 minutos a temperatura de reflujo, se enfrió la mezcla de reacción y se acidifico con HCl al 10%, la fase orgánica se extrajo con AcOEt (30ml x 3 veces), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y evaporó y se obtuvo 28.2 mg (52.1%) del compuesto **2k**. p.f. 127-128 °C.

### 5.7.2.12. 2-formil-(16 $\beta$ ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2I]



**Figura 32.** Obtención de la 2-formil-(16 $\beta$ ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2I].

Se disolvieron 525.2 mg (1.15 mmoles) de argentatina B (**2**) en 12 ml de piridina seca, contenida en atmósfera inerte, y se adicionaron 5 ml de formiato de etilo (recién destilado), junto con una disolución de sodio en MeOH absoluto (0.18 g / 2.5 ml). La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La aparición de un color ocre y/o la formación de un precipitado insoluble se consideraron como evidencia de la reacción, la mezcla de reacción se colocó en una disolución fría de 6.6 ml de ácido acético en 74.4 ml de agua. Como resultado de la acción anterior, se observó la aparición de un precipitado, el cual fue extraído con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con agua y extrajo con una disolución de hidróxido de potasio al 2%. La solución básica se lavó con éter, después se acidificó con ácido acético glacial y finalmente se extrajo con cloruro de metileno. La fase de cloruro de metileno final se secó y concentró a presión reducida para obtener un producto semisólido impuro el cual se purificó por cristalizaciones sucesivas para obtener 397.2 mg de la 2-formil-(16 $\beta$ ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**2I**). p. f. 210-214 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3546.9 (OH), 3448, 2953.3 (C-H), 2874.5, 1642.9, 1588.2, 1460.3, 1374.2, 1113.1, 1058.2. EM-IE m/z (%): 484



(M<sup>+</sup>,15), 466 (5), 425 (M<sup>+</sup>-59, 100), 407 (25), 233 (33), 175 (42), 109 (35), 85 (44), 59 (25), 43 (24). RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0.48 (d, J= 4.5, 1H, H-19), 0.68 (d, J= 4.5, 1H, H-19'), 0.92(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.95(d, J= 6.3, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.10(s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.85 (d, J= 15, 1H, H-1), 2.59 (d, J= 15, 1H, H-1'), 3.59 (dd, J= 2.1, J= 12.5, 1H, H-24), 4.61 (c, 1H, H-16), 8.67 (d, J=2.4, 1H, H-31), 14.84 (d, J= 2.4, 1H, OH). RMN <sup>13</sup>C (75.4 MHz) δ ppm: 31.8 (C-1), 106.6 (C-2), 190.4 (C-3), 42.7 (C-4), 48.2 (C-5), 21.4 (C-6), 25.7 (C-7), 44.6 (C-8), 19.4 (C-9), 23.6 (C-10), 25.6 (C-11), 32.6 (C-12), 45.8 (C-13), 45.7 (C-14), 45.1 (C-15), 74.8 (C-16), 57.4 (C-17), 19.1 (C-18), 30.0 (C-19), 29.0 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.3 (C-25), 23.8 (C-26), 25.6 (C-27), 19.8 (C-28), 24.4 (C-29), 21.6 (C-30), 189.0 (C-31).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A partir de la resina, subproducto del proceso de industrialización de la especie *Parthenium argentatum*, se obtuvieron un total de 193 fracciones por cromatografía en columna abierta. Las fracciones con perfil cromatográfico similar se reunieron. De las fracciones eluidas con una mezcla 8:2 Hex:AcOEt se obtuvieron 10.9 g de Argentatina B (**2**), con un rendimiento del 9.14 % con respecto a la cantidad de resina utilizada. De las fracciones eluidas con una mezcla 6:4 de Hex:AcOEt se obtuvieron 7.12 g de Argentatina A (**1**), con un rendimiento del 6.45 %. De las fracciones eluidas con AcOEt se obtuvieron 0.59 g de Argentatina D (**3**), con un rendimiento del 0.5 %.

Estos compuestos fueron identificados por sus datos espectroscópicos y físicos (espectros de IR, EM, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, punto de fusión). Los datos físicos y espectroscópicos son consistentes con los publicados en la literatura (Komoroski et al., 1986; Martínez et al., 1990; Romo de Vivar et al., 1990)

Es conocido que un compuesto anticanceroso también podría tener actividad antiinflamatoria (Grivennikov et al., 2010; Balkwill and Mantovani, 2012a). Teniendo en cuenta esta idea y basados en informes anteriores sobre el efecto antiproliferativo contra varias líneas celulares de cáncer humano de la argentatinas A (**1**), B (**2**) y D (**3**) y algunos de sus derivados (Parra-Delgado et al., 2005, 2006) probamos las actividades anti-inflamatorias de **1-3** (Tabla 4) en el modelo de edema inducido por TPA en ratones.

**Tabla 4.** Actividad Antiinflamatoria de las argentatinas A (1), B (2) y D (3)

Compuesto	DE <sub>50</sub> (IC) (mg/oreja)	DE <sub>50</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol/oreja)
1	0.13 (0.1, 0.17) r = 0.971	2.8
2	0.07 (0.06, 0.08) r = 0.963	1.5
3	0.35 (0.30, 0.42) r = 0.982	7.6
Indometacina	0.16 (0.15, 0.18) r = 0.951	4.5

La dosis que causa 50% de efecto anti-inflamatorio (DE<sub>50</sub>) se calculó a partir de una ecuación de regresión (r) utilizando datos significativos (P <0,05) después de una curva dosis-respuesta (n = 4-8). IC = intervalo de confianza. ND = no se determinó.

El modelo de edema inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) se utilizó para evaluar la actividad antiinflamatoria de **1-3** (Nadinic et al., 1999; Oviedo-Chavez et al., 2005). Nuestros resultados mostraron que estos triterpenos presentaron una actividad antiinflamatoria relacionada con la dosis. Además, **2** fue aproximadamente dos veces más potente que la indometacina (ver Tabla 4).

Por otro lado, se estimuló la actividad de los macrófagos *in vitro* con lipopolisacárido (LPS), para producir un número de citoquinas y otros mediadores inflamatorios, incluyendo TNF $\alpha$  y óxido nítrico (ON), ambos contribuyen directamente a la capacidad de los macrófagos para matar invasores: bacterias y células tumorales y los patógenos del choque séptico. Se evaluaron los efectos de **1** y **2** en la producción de ON a partir de macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos (M $\phi$ ) mostraron un incremento en la liberación de óxido nítrico cuando fueron estimulados con LPS

(Tabla 5). Nuestros resultados mostraron que **1**, a 31 y 100  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la liberación de óxido nítrico por los macrófagos tratados con LPS.

Sin embargo **2** fue activo sólo a 100  $\mu\text{M}$ . Un comportamiento similar se observó cuando **1** y **2** fueron evaluados en la producción de NO a partir de macrófagos en reposo.

**Tabla 5.** Producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón inducida por **1** y **2**.

Grupo		3.1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	31 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
1 M $\phi$ with LPS	50.6 $\pm$ 5.3	48.7 $\pm$ 4.7	41.7 $\pm$ 4.9	34.5 $\pm$ 1.8*	17.8 $\pm$ 2.3*
2 M $\phi$ with LPS	53.7 $\pm$ 6.2	47.6 $\pm$ 6.6	40.1 $\pm$ 4.9	41.9 $\pm$ 6.0	23.6 $\pm$ 2.7*
1 M $\phi$ without LPS	30.84 $\pm$ 2.9	33.9 $\pm$ 1.8	25.5 $\pm$ 2.4	22.6 $\pm$ 1.0*	15.9 $\pm$ 2.3*
2 M $\phi$ without LPS	29.6 $\pm$ 2.3	39.6 $\pm$ 1.0*	31.6 $\pm$ 0.9	30.0 $\pm$ 2.6	20.0 $\pm$ 1.5*

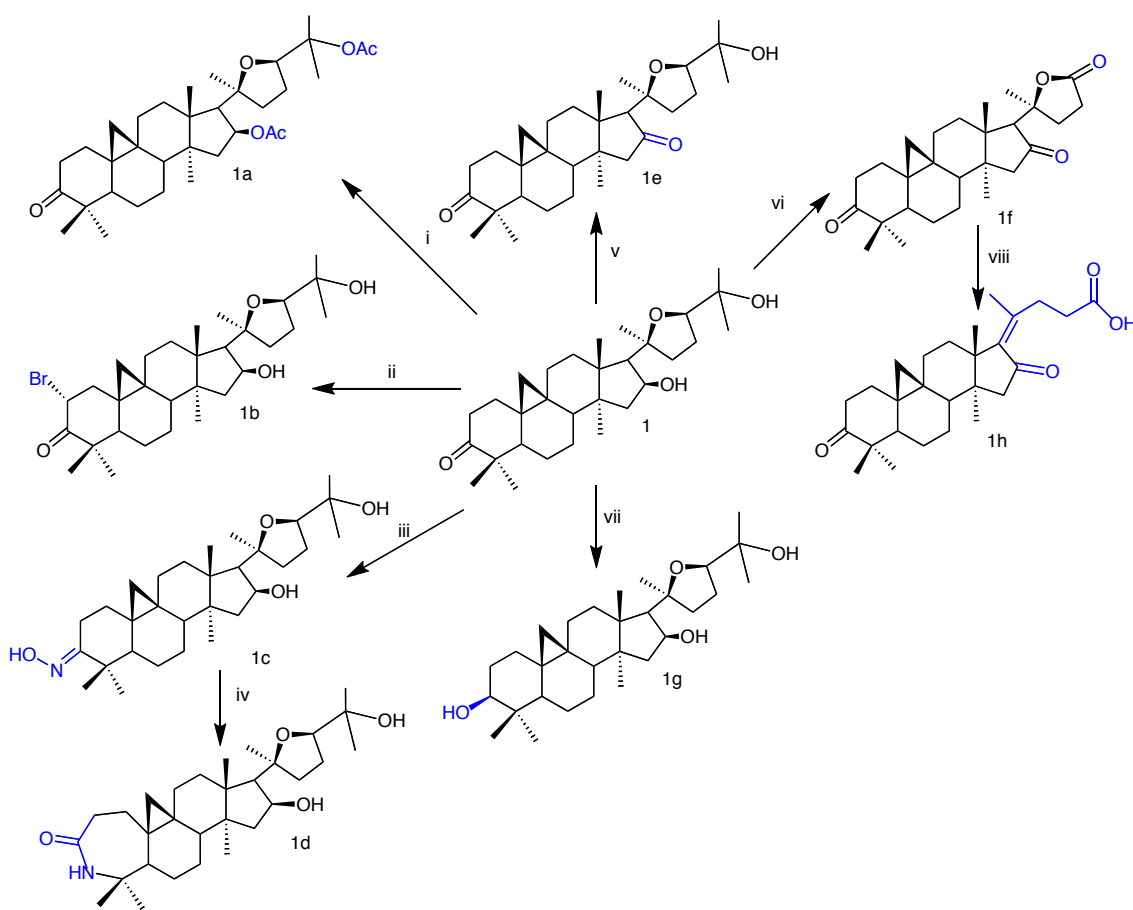
M $\phi$ = macrófagos, LPS = lipopolisacárido. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE, n = 3-5. \* P <0,05 significativamente diferente en comparación con el control (prueba de Dunnett).

Sin embargo, los resultados de la viabilidad de los macrófagos determinada en el ensayo MTT mostró que tanto **1** y **2** disminuyeron la viabilidad en un 63% y 53%, respectivamente, a dosis de 50  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugieren que la disminución en la producción de ON mostrada por los compuestos **1** y **2** fue debido a la influencia sobre la viabilidad celular inducida por estos triterpenos.

Estos resultados, motivaron el empleo de las argentatinas A y B para la

obtención de diversos derivados que permitieran el establecimiento de relaciones estructura- actividad.

A partir de la argentatrina A (**1**) se obtuvieron 8 derivados por medio de transformaciones químicas **1a-1h**. Figura 33



**Figura 33.** Derivados de la argentatrina A (**1**) **1a-1h**. Condiciones de reacción y rendimiento (i)  $\text{AcONa}/(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , 99%; (ii)  $\text{Br}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$ , 94 %; (iii)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 88%; (iv)  $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ , 54%; (v)  $m\text{-CPBA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 92%; (vi)  $\text{CrO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ , 58%; (vii)  $\text{NaBH}_4$  63%; (viii)  $\text{EtOH}$ ,  $\text{KOH}$ , 61%

El diacetato **1a** se obtuvo por medio de la acetilación de **1** con acetato de sodio

y anhídrido acético en un 99% de rendimiento. En el espectro de IR de dicho producto se observa una banda intensa a  $1727.1\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los carbonilos de los grupos acetato. A diferencia del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1**, se observa una señal adicional a  $\delta$  2.02 ppm que corresponde a los hidrógenos (metilo) de los grupos acetato. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **1a**, se observa la presencia de cuatro señales adicionales a  $\delta$  22.13, 22.68, 170.3, 170.44 de los carbonos de los metilos y carbonilos de dos grupos acetato.

El tratamiento de la argentatina A con una solución de bromo en ácido acético, permitió la obtención del derivado **1b** con un 94% de rendimiento. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de dicho derivado, se observa la presencia de una señal doble de dobles a 5.11 ppm ( $J= 6.5$  y  $12.8$  Hz) correspondiente al hidrógeno ubicado en la posición dos (H-2). Las constantes de acoplamiento indican una relación sinclinal y antiperiplanar que evidencian la posición  $\beta$  axial de dicho protón y por lo tanto  $\alpha$  ecuatorial del átomo de bromo.

Al reaccionar **1** con clorhidrato de hidroxilamina en piridina se obtuvo el derivado **1c** con un 88% de rendimiento. En el espectro de IR se observa la desaparición de la banda correspondiente al carbonilo en C-3, para aparecer una pequeña banda a  $1638.5\text{ cm}^{-1}$ , asociada a la presencia de C=N; así también en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa una señal a  $\delta$  167.1 ppm asignada al C-3.

Al tratar la oxima de la argentatina A **1c** con anhídrido trifluoro acético se

obtuvo un compuesto identificado como *16-fluoro-acetoxi-lactama de argentatina A*. Compuesto que mostró en el espectro de infrarrojo el carbonilo de la lactama en  $1699.9\text{ cm}^{-1}$  y el carbonilo correspondiente al acetato en posición 16 a  $1777\text{ cm}^{-1}$ , lo cual corroboró la formación de dicho intermediario aislado en trabajos anteriores (Pineda et.,1999). Este producto fue tratado con carbonato de potasio en metanol, el cual se hidrolizó para dar lugar a la lactama de argentatina A **1d**, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa una señal a  $\delta$  175.6 ppm asignada al C-3 que esta más desplazada a campos bajos comparada con la señal asignada al mismo carbono en la lactona **1c**.

La reacción de la argentatina A con ácido meta cloro peroxibenzoico produjo un sólido blanco **1e**, con un 78% de rendimiento; en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa dos señales a  $\delta$  217.1 y 218.5 ppm asignadas a los carbonos C-3 y C-16 respectivamente.

La oxidación de la argentatina A (**1**) con  $\text{CrO}_3$  generó el derivado **1f**. El espectro de IR de este derivado muestra, entre otras, tres bandas intensas a  $1768.64$ ,  $1737.46$  y  $1703.84\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a tres carbonilos: cetona cíclica de seis miembros, éster y cetona cíclica de cinco miembros. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observa la pérdida de dos señales de grupos metilo y de la correspondiente a H-24. Así también, en RMN  $^{13}\text{C}$  se observa una señal a  $\delta$  177.2 ppm (C=O, éster), la aparición de una señal a  $\delta$  215.8 ppm (C=O) y la desaparición de las señales de los carbonos C-25, C-26 y C-27, tales evidencias confirman la presencia de la pérdida del hidroxil isopropilo en C-24, la generación de la lactona de cinco miembros en el anillo E y la cetona de

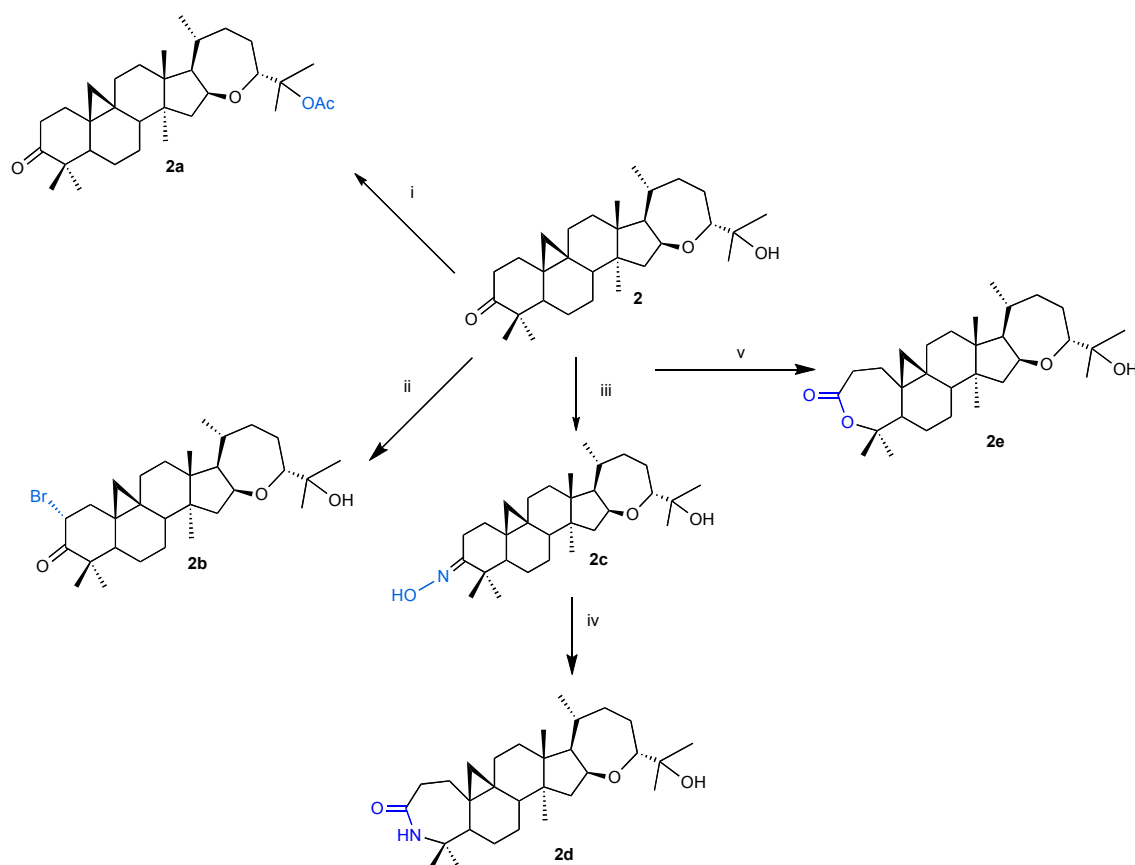
cinco miembros en el anillo D.

La reducción de argentatina A (**1**) se efectuó mediante la utilización de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) obteniéndose un sólido blanco **1g** con peso molecular de 474. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observan dos señales a  $\delta$  2.83 y 4.59 ppm que corresponden a los hidrógenos H-24 y H-16 respectivamente y el alcohol en C-3, así como las señales dobles a 0.85 ppm y 0.64 ppm correspondientes a los hidrógenos H-19, H-19' del ciclopropano y las señales simples asignadas a los metilos presentes. Por otro lado en RMN  $^{13}\text{C}$  se observa un desplazamiento químico de  $\delta$  78.8 ppm para el carbono C-3 base del hidroxilo y un desplazamiento de 40.6 ppm para el carbono C-4  $\alpha$  al carbono base de hidroxilo a diferencia del desplazamiento de 50.2 ppm observado en **1**. Estos resultados confirman la ausencia del carbonilo de cetona en C-3.

La reacción de **1f** con hidróxido de potasio en etanol generó **1h** como un producto cristalino de peso molecular de 426. En RMN  $^1\text{H}$  se observan señales típicas para el ciclopropano a 0.64 y 0.86 ppm, así como las señales simples asignadas a los grupos metilo presentes en el rango de 0.98 a 1.82 ppm. No se observan las señales para los hidrógenos en C-16 y C-24 por otro lado en RMN  $^{13}\text{C}$  se observan señales a 216.0 ppm y 207.3 ppm asignados a los carbonilos en C-3 y C-16, así como las señales a 141.7 y 149.5 ppm correspondientes a los carbonos  $\text{sp}^2$  C-17 y C-20 de la doble ligadura formada durante la apertura de la lactona; por otro lado se observa la señal a 178.6 ppm correspondiente al carbonilo en C-24 del ácido formado.



A partir de la argentatina B (**2**) por medio de transformaciones químicas se obtuvieron 5 derivados **2a-2e**, ver figura 34



**Figura 34.** Derivados de la argentatina B (**2**) **2a-2e**. Condiciones de reacción y rendimiento (i) AcONa/(CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, 86.1%; (ii) Br<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>COOH, 64.3%; (iii) NH<sub>2</sub>OH.HCl/C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 87.1%; (iv) CF<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 54%; (v) m-CPBA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 92.

La reacción de **2** con acetato de sodio y anhídrido acético generó el acetato **2a** con un rendimiento del 86.1%. En comparación con **2**, el espectro de IR muestra una banda adicional a 1734.3 cm<sup>-1</sup> que corresponde al carbonilo de un grupo acetato y que concuerda con la presencia de una señal simple en RMN <sup>1</sup>H a 1.96 ppm típica de los hidrógenos de un metilo de un grupo acetato.

La reacción de la argentatina B (**2**) con bromo en ácido acético generó el bromoderivado **2b** en un 64.3%. En el espectro de masas de dicho derivado se observó un pico con m/z 534 que correspondía al ión molecular para la fórmula calculada C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>BrO<sub>3</sub>. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H se observó la presencia de una señal doble de dobles a 5.11 ppm que correspondía al H-2. Las constantes de acoplamiento de 6.6 y 12.8 Hz de tal señal típicas de interacciones espín-espín de protones vecinales en conformación sinclinal y antiperiplanar respectivamente, permitieron inferir que el H-2 se encontraba en posición β-axial y el átomo de bromo en α-ecuatorial.

La oxima **2c** se obtuvo por medio de la reacción de **2** con clorhidrato de hidroxilamina con un rendimiento del 94.4%. La identidad del derivado **2c** se logró por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, el espectro de masas de **2c**, muestra un pico de m/z 471 que corresponde al ión molecular del compuesto esperado. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observa, entre otras, una señal a δ 168.9 ppm correspondiente al carbono sp<sup>2</sup> en posición 3 (C=N).

El tratamiento de la oxima **2c** con anhídrido trifluoroacético permitió la obtención de la lactama **2d**. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H, aparece, una señal múltiple a 2.56 ppm que integra para dos hidrógenos de los cuales uno corresponde a un alcohol. Además, se observa una señal a 6.43 ppm asignada al N-H de una lactama. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observa, además de las señales correspondientes a la argentatina B (**2**), la presencia de una señal a δ 177.6 ppm, que corresponde a un carbono sp<sup>2</sup>, asignado al carbonilo de una

lactama y que concuerda con la banda intensa a  $1650\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR.

El tratamiento de **2** con ácido metacloropexibenzoico mediante un típico arreglo Baeyer-Villiger permitió la obtención de la lactona **2e**, el espectro de masas de **2e** muestra un pico de  $m/z$  472 que corresponde al ión molecular del compuesto esperado.

Se evaluó in vivo la actividad anti-inflamatoria de cada derivado usando las mismas condiciones experimentales empleadas para la evaluación de **1-3**. De acuerdo con nuestros resultados, todos los derivados sintetizados mostraron actividad anti-inflamatoria. Las dosis de todos los compuestos están en el orden de  $10^{-4}$  mmol/oreja. Los derivados de **1a-1f** fueron menos potentes como agentes anti-inflamatorios que el compuesto original argentatina A (**1**), el valor  $CI_{50}$  para **1d** no se determinó (Tabla 6). Sin embargo, el derivado **1b** fue más potente que la indometacina, el fármaco de referencia. Es interesante notar que cambiando un grupo hidroxilo de **1** por un grupo cetona en el C-16 como en el compuesto **1e**, la actividad disminuyó más de cuatro veces en comparación con la actividad de **1**. Por otra parte, la actividad de **1g** en comparación con la de **1** es aproximadamente la misma. La presencia del  $\beta$ -hidroxilo grupo en C-3 como en **1g** no es relevante para la actividad anti-inflamatoria. La apertura del anillo de cinco miembros de **1** para producir el ácido carboxílico **1h**, que fue el compuesto más activo de la serie indica la posibilidad de que los derivados de cadena abierta podría ser más activos.

**Tabla 6.** Actividad Antiinflamatoria de los derivados de la argentatina A (**1**)  
**1a-1h**

Compuesto	DE <sub>50</sub> (IC) (mg/oreja)	DE <sub>50</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol/oreja)
<b>1a</b>	0.36 (0.26, 0.49) r = 0.985	6.5
<b>1b</b>	0.17 (0.15, 0.21) r = 0.999	3.1
<b>1c</b>	0.26 (0.18, 0.38) r = 0.995	5.3
<b>1d</b>	ND	ND
<b>1e</b>	0.57 (0.42, 0.82) r = 0.997	12.1
<b>1f</b>	0.28 (0.16, 0.41) r = 0.937	6.5
<b>1g</b>	0.11 (0.10, 0.13) r = 0.978	2.3
<b>1h</b>	0.06 (0.05, 0.08) r = 0.990	1.4
Indometacina	0.16 (0.15, 0.18) r = 0.951	4.5

La dosis que causa 50% de efecto anti-inflamatorio (DE<sub>50</sub>) se calculó a partir de una ecuación de regresión (r) utilizando datos significativos (P <0,05) después de una curva dosis-respuesta (n = 4-8). IC = intervalo de confianza. ND = no se determinó.

Con respecto a los derivados de la argentatina B (**2**) (figura 34), ninguna de las modificaciones estructurales consiguió compuestos más activos que compuesto original **2** el compuesto **2b** mostro una actividad similar a la de **2** (1.5 x 10<sup>-4</sup>mmol/oreja), (Tabla 7). No se determinó el valor IC<sub>50</sub> para el compuesto **2a**.

**Tabla 7.** Actividad Antiinflamatoria de los derivados de la Argentatina B (**2**)  
**2a-2e**

Compuesto	DE <sub>50</sub> (IC) (mg/oreja)	DE <sub>50</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol/oreja)
<b>2a</b>	ND	ND
<b>2b</b>	0.08 (0.06, 0.11) r = 0.942	1.5
<b>2c</b>	0.45 (0.31, 0.65) r = 0.999	9.6
<b>2d</b>	0.12 (0.10, 0.15) r = 0.949	2.5
<b>2e</b>	0.22 (0.17, 0.28) r = 0.979	4.7
Indometacina	0.16 (0.15, 0.18) r = 0.951	4.5

La dosis que causa 50% de efecto anti-inflamatorio ( $DE_{50}$ ) se calculó a partir de una ecuación de regresión ( $r$ ) utilizando datos significativos ( $P < 0,05$ ) después de una curva dosis-respuesta ( $n = 4-8$ ). IC = intervalo de confianza. ND = no se determinó.

Es bien sabido que la COX-2 es una de las principales enzimas involucrada en el edema inducido por TPA (Salazar et al., 2011). Con el fin de adquirir conocimientos sobre el mecanismo de acción de los compuestos reportados en este trabajo, se evaluó la inhibición de la actividad de COX-2 de los compuestos **2**, **1h** y **2b** (Tabla 8). En particular, nuestros resultados mostraron que a 30  $\mu$ M el compuesto **2** inhibió 78,77% de la actividad de la enzima. Sorprendentemente, el compuesto **1h**, uno de los más activos en ensayo in vivo de TPA, no muestra inhibición de la COX-2. Del mismo modo, el compuesto **2b** que se encuentra entre los compuestos más activos en el ensayo de TPA a 100  $\mu$ M solo inhibe la COX-2 en 12%, se utilizó como control positivo celecoxib. Estos resultados apoyan la complejidad conocida de procesos inflamatorios, donde la modulación de la actividad de COX-2 juega un papel fundamental, pero otros mecanismos biológicos no se puede descartar (Park et al., 2008).

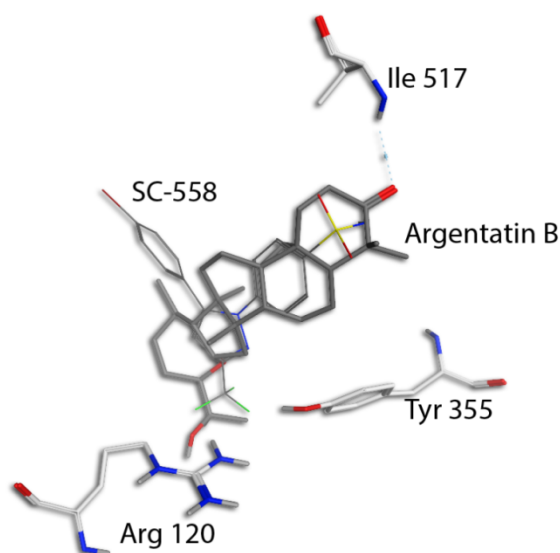
**Tabla 8.** Inhibición de COX-2 por la argentatina B (**2**) y los derivados **1h** y **2b**

Compuesto	Concentración (mM)	Inhibición (%)
<b>2</b>	30	78.77 $\pm$ 5.43
<b>1h</b>	30	--
	100	--
<b>2b</b>	30	--
	100	12.18 $\pm$ 4.91
Celecoxib	30	91.34 $\pm$ 2.72

Estudios anteriores indicaron que el derivado **2b** mostró una buena actividad anti-proliferativa contra algunas líneas de cáncer de humanos (Parra-Delgado et al., 2006), por lo tanto **2b** tiene actividades anti-inflamatoria y anti-proliferativa .

La argentatina B mostró actividad inhibitoria de COX-2 y como las estructuras de rayos X de la enzima COX-2 están disponibles, se realizó estudios de acoplamiento de argentatina B con la COX-2. La modulación de un simple mecanismo biológico fue el modelo racional de descubrimiento de fármacos durante la última década. Sin embargo, esta idea ha cambiado de un simple blanco y apunta a múltiples blancos (Medina-Franco et al., 2013). Este nuevo paradigma tiene sus raíces en el concepto de poli farmacología. La interacción de pequeñas moléculas con múltiples blancos da una justificación no sólo para efectos secundarios no deseados, sino también para la posibilidad de encontrar actividades biológicas adicionales de los compuestos ya bioactivos. En el caso de medicamentos incluye el área de la reutilización de drogas, más recientemente, esto se ha extendido a la búsqueda de la actividad biológica de otras bases de datos de compuestos, tales como los compuestos químicos que producen sabores y productos naturales. Una lista completa de las interacciones de unión entre el inhibidor co-cristalizado, SC-558, y la COX-2 se describe en otra parte (Medina-Franco et al., 2012). Los mas importantes son los siguientes: (A) el grupo trifluorometilo orienta los residuos de Arg 120 y Tyr 355, el bloqueo de esta región es el sello de la inhibición de la COX, (B) la fracción fenil sulfonamida, que podría ser responsable de selectividad entre isoformas, interactúa a través de enlaces de hidrógeno con His 90, Gln 192 y

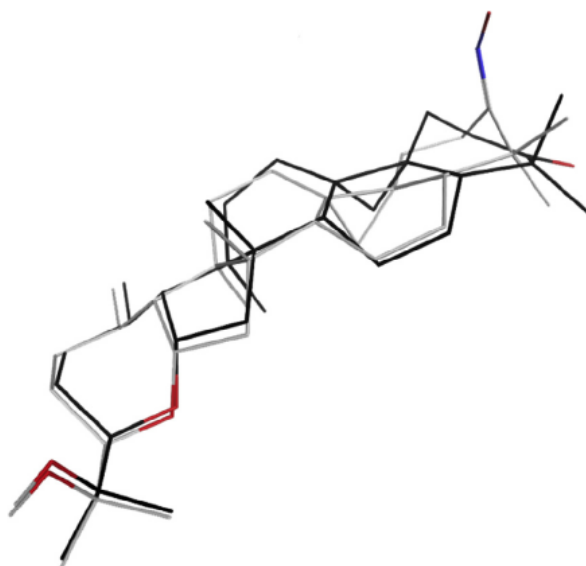
Arg 513, y (C) Val 523 y Val 434 parecen promover la selectividad de COX-2 facilitando la entrada de un sitio de unión adyacente, que es enterrado en la ausencia de un ligando y inexistente en COX-1 (Medina-Franco et al., 2012). Estas características estructurales se utilizaron para racionalizar el modo de la unión de la argentatina B (**2**) en el sitio activo de la COX-2.



**Figura 35.** Modo de enlace de la argentatina B (**2**) dentro del sitio activo de COX-2, obtenida del ajuste de inducido “docking”. SC-558 se muestra como referencia.

La Figura 35 muestra el modo de unión previsto para argentatina B (**2**) ( $DE_{50} = 1,5 \times 10^{-4}$  mmol/oreja) en el sitio de unión de la COX-2. Las líneas grises gruesas y oscuras describen la argentatina B, SC-558 se muestra como una línea fina de color gris oscuro y los tres residuos relevantes son de color blanco. En esta posición, el grupo -OH de argentatina B se orienta cercano Arg 120 con una distancia de 2,58 Å. La interacción con Arg 120 parece ser crucial para la inhibición de la COX. El grupo carbonilo, en el otro extremo de la molécula, se orienta hacia los residuos asociados con la selectividad, el grupo fenilsulfonamida SC-558 ocupa esta región, y el grupo carbonilo de la

argentatina B tiene una interacción de enlace de hidrógeno con Ile 517. Por comparación, el análogo de **2c** ( $ED_{50} = 9,5 \times 10^{-4}$  mmol/oreja) también fue acoplado. La orientación general coincidió con la de la argentatina B. El compuesto **2c** contiene un grupo funcional oxima; que se desprotona a pH = 7, el grupo N-O ocupa la misma región que la del grupo carbonilo en argentatina B y hace una interacción de enlace de hidrógeno con Arg 513. Una mirada más cercana en la estructura revela una distorsión conformacional con respecto a la argentatina B. En la Figura 36 se muestra la comparación de como se obtiene el acoplamiento de la argentatina B (**2**) y el compuesto **2c**. Por último, el compuesto **1** también fue acoplado en sitio activo de la COX-2.

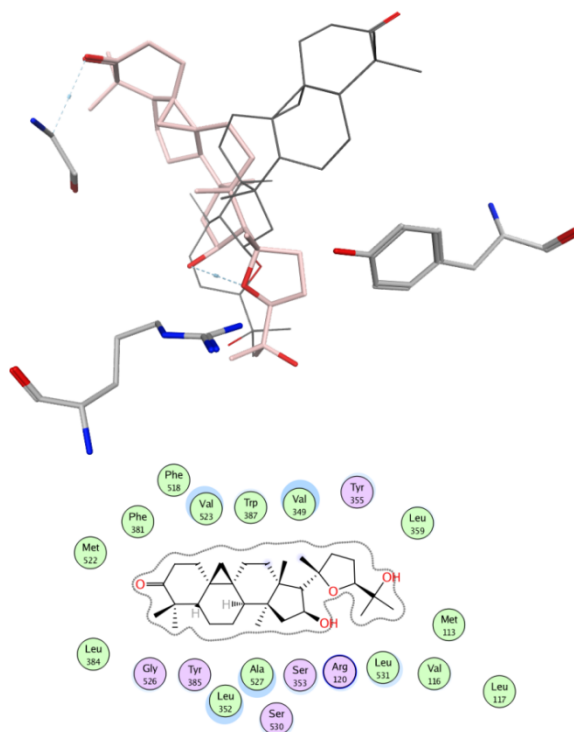


**Figura 36.** Comparación de la argentatina B (**2**) (negro) y el compuesto **2c**. Conformaciones y orientaciones relativas que se obtuvieron del ajuste inducido de acoplamiento “docking”.

Como se puede ver en la figura 37 la argentatina A (**1**), hace una interacción de enlaces de hidrógeno con Gly 527 y el átomo de oxígeno del grupo furano está a 2,67 Å para el átomo de hidrógeno más cerca de Arg 120, por otra parte, este



átomo de oxígeno hace un enlace de hidrógeno intramolecular con el grupo -OH vecino, por lo que es menos accesible para interactuar con Arg 120.



**Figura 37.** Modo de unión propuesto y mapas de interacción 2D de la argentatina A (1), en el sitio activo de la COX-2. Como referencia, la argentatina B (2) se muestra como líneas finas negras en 3D.

Es importante observar que aunque la COX-2 es relevante en el modelo de edema inducido por TPA hay otras enzimas en el proceso antiinflamatorio que afectan a este ensayo, y no puede ser descartado que los triterpenos evaluados en el modelo de edema inducido por TPA también puede afectar a otras vías enzimáticas.

Tomando en cuenta que la Argentinina B tiene actividad antiinflamatoria e inhibe la actividad de COX-2 y la evidencia sobre la implicación de los procesos inflamatorios en el cáncer, que las células inflamatorias y los mediadores

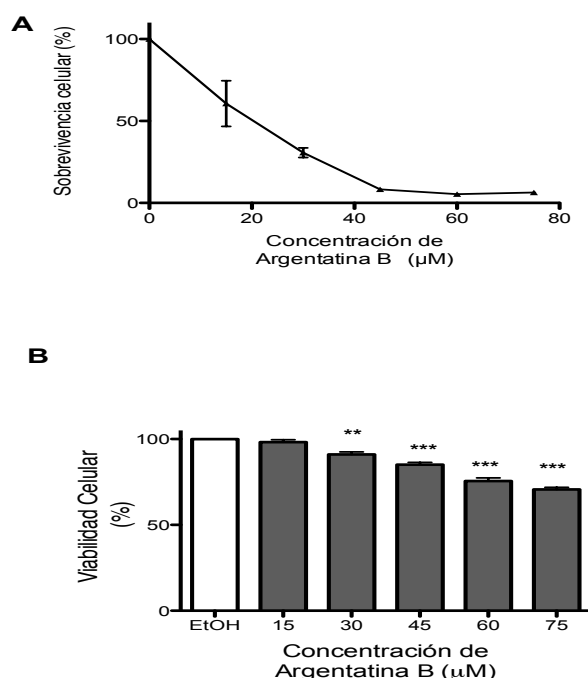
inflamatorios en el microambiente tumoral pueden ser blancos moleculares para el tratamiento o la prevención, y que algunos fármacos antiinflamatorios son útiles en la prevención y tratamiento del cáncer (Balkwill and Mantovani, 2010). Así como que mayoría de los cánceres progresan a través de la acción de múltiples vías que incluyen la COX y los hallazgos que sugieren que la inhibición de la actividad de COX-2, y por lo tanto la disminución resultante en la producción de prostaglandinas puede contribuir al efecto anticancerígeno bien documentado de fármacos antiinflamatorio en cáncer de colon; así como que se ha demostrado que, inhibidores selectivos de la COX-2 modulan eventos tumorigénicos, angiogénicos y apoptóticos que producen una reducción de la incidencia y progresión del tumor (Masferrer et al., 2000), se decidió evaluar la actividad citotóxica y citostática producida por la argentatina B (**2**) y sus derivados, en células de cáncer de colon RKO.

Para caracterizar el efecto de citotoxicidad de la Argentatina B (**2**), se emplearon dos ensayos de citotoxicidad que miden diferentes parámetros de muerte celular: FMCA (reducción del colorante) y TBE (exclusión del colorante), que evalúan la viabilidad y/o el estado metabólico de las células de cáncer basado en la actividad respiratoria mitocondrial y la integridad de la membrana celular, respectivamente. El efecto de Argentatina B (**2**) se evaluó en células de cáncer de colon RKO, a 24 h de exposición con diferentes concentraciones de **2**.

Cuando las células fueron tratadas con 15-75  $\mu\text{M}$  de **2** en el ensayo de supervivencia FMCA se muestra una reducción significativa dependiente de la dosis; de acuerdo con la Figura 38A, la  $\text{CI}_{50}$  es de  $25,04 \pm 0,38 \mu\text{M}$ . Aunque se observo una actividad asintótica mínima desde 45  $\mu\text{M}$  a 75  $\mu\text{M}$ .

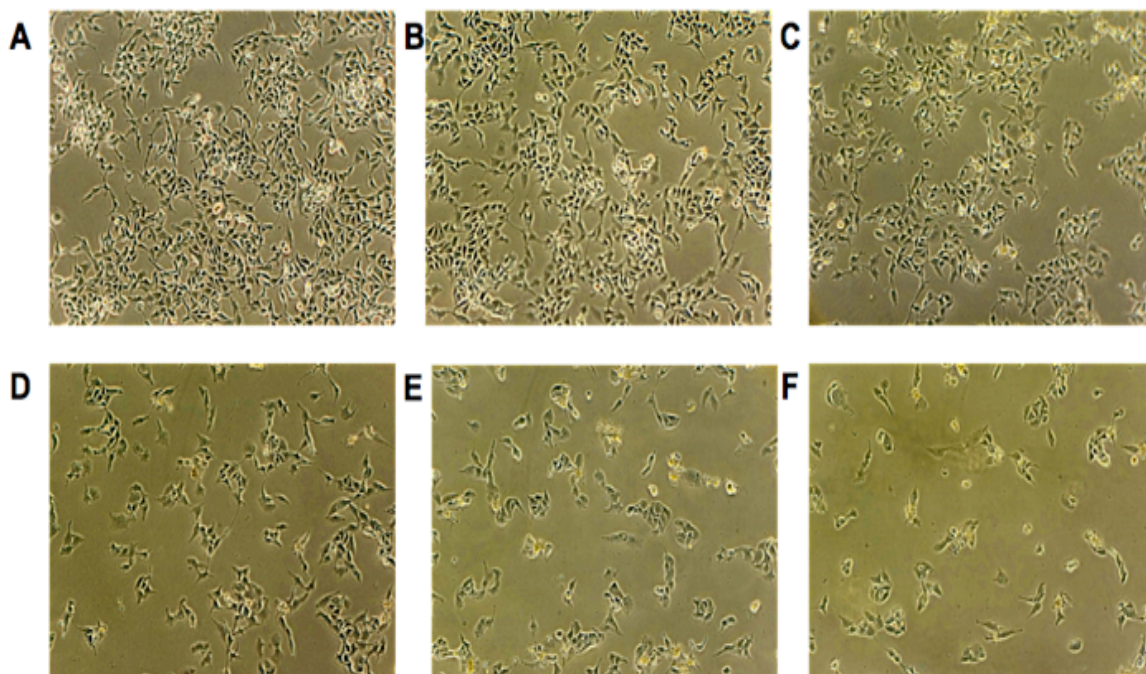
Al mismo tiempo, se observó los cambios morfológicos celulares durante de tratamiento con **2** (Figura 39). A bajas dosis de tratamiento, el efecto citostático fue evidente, como se muestra por la inhibición de la proliferación celular en el ensayo de TBE. A dosis altas, el efecto citotóxico fue pronunciado, las células murieron y se desprendieron de la superficie. En un estudio previo (Parra-Delgado et al., 2005) se informó que los linfocitos en proliferación tratados con **2** no mostraron ningún efecto sobre la viabilidad celular a las concentraciones ensayadas, pero decrementó la proliferación celular.

No obstante que tanto en el ensayo de FMCA así como por observación de los cambios morfológicos se demostró el efecto citotóxico de **2**, en el ensayo de TBE a 60  $\mu\text{M}$  la citotoxicidad es menos de 30%. Éste resultado indica que en estas condiciones la integridad de la membrana no se ve muy afectada por la adición de **2** durante 24 horas (Figura 38B).



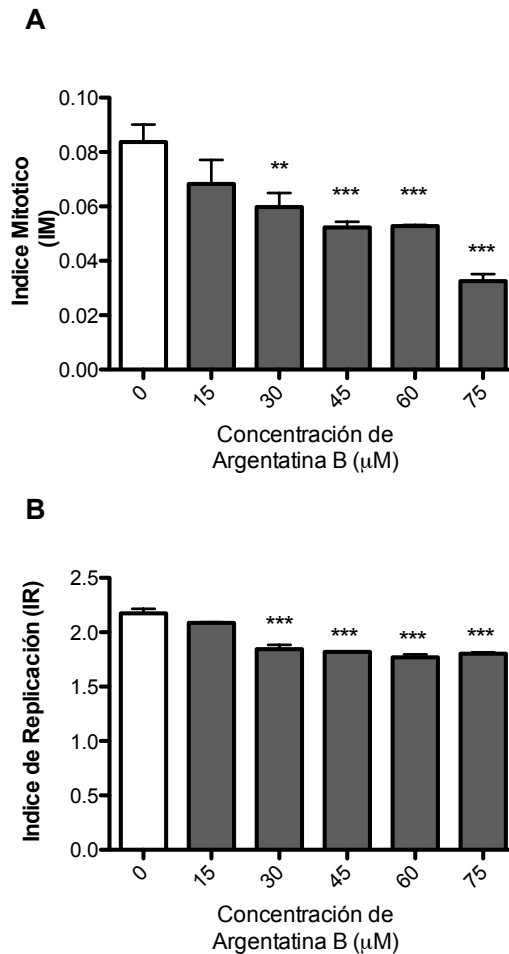
**Figura 38.** Células RKO tratadas con Argentatina B (**2**). **A**) Supervivencia celular evaluada por el ensayo de FCMA. **B**) Viabilidad evaluada por el ensayo

TBE. Los datos representan la media  $\pm$  EEM,  $n=3$ . Los símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas: \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  con respecto a las condiciones del control (EtOH).



**Figura 39.** Efecto de la Argentina B (**2**) en los cambios morfológicos de células RKO. Las células se trataron con A) EtOH 0,1%, B) 15, C) 30, D) 45, E) y F 60) 75  $\mu$ M de **2** durante 24 h, se visualizaron bajo microscopio y se fotografiaron. Ampliación: 40X.

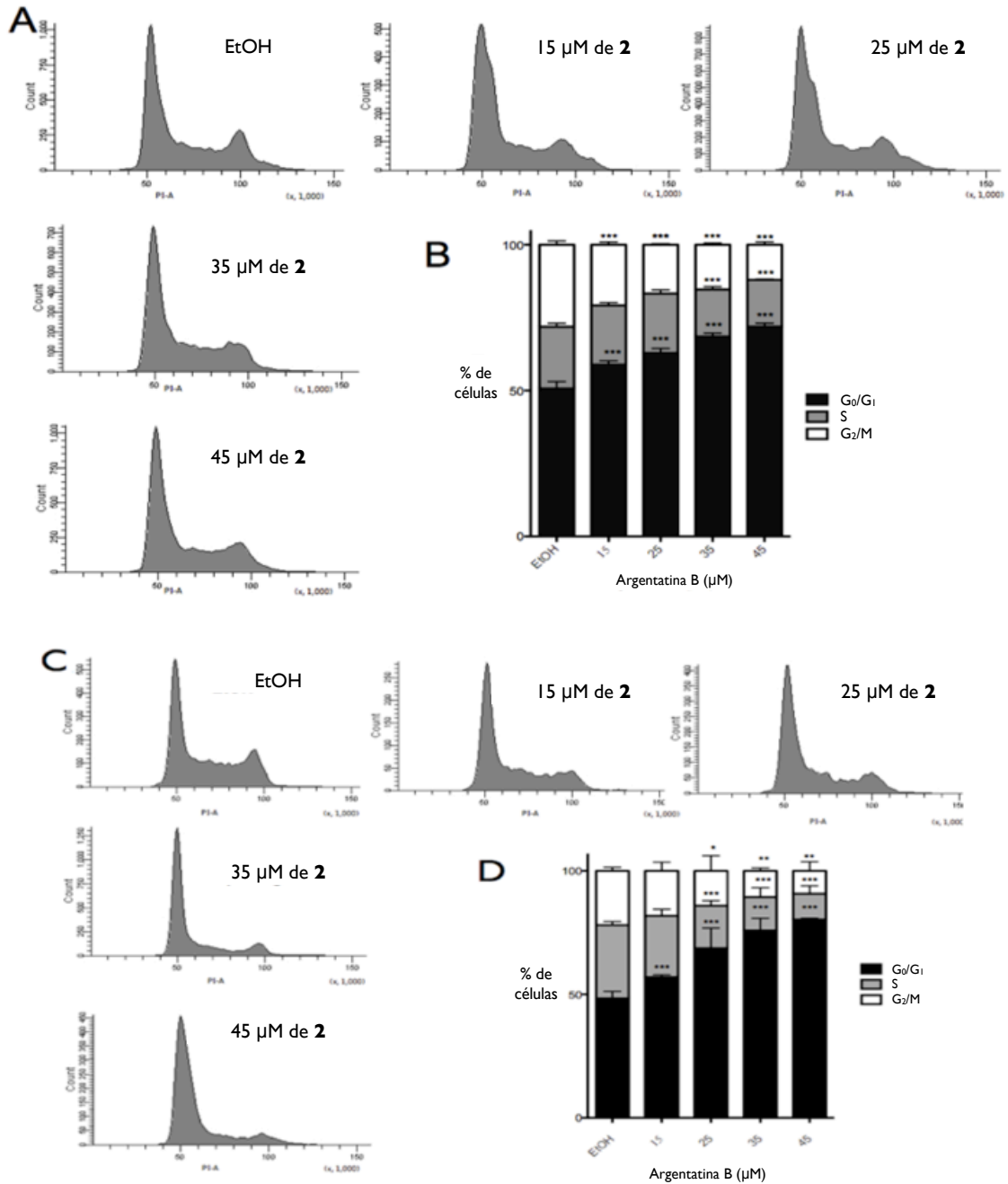
Se evaluó el efecto antiproliferativo y del índice mitótico (IM), que indica la proporción de células en división, y el índice de replicación (IR), que representa el número de divisiones celulares y por lo tanto la tasa de proliferación celular (Figura 40). Como se muestra en la Figura 40A, el IM disminuyó de una manera dependiente de la dosis en respuesta a argentinina B (**2**). Sin embargo el índice de replicación no mostró una gran reducción por la adición de **2**. Los efectos sobre el IM y IR fueron estadísticamente significativos a partir de la dosis de 30  $\mu$ M de **2** (Figura 40 A y B).



**Figura 40.** Células RKO tratadas con Argentinina B. **A)** Índice mitótico (IM) **B)** Índice de replicación (IR). Los datos representan la media  $\pm$  EEM,  $n=3$ . Los símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas: \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p< 0.001$  con respecto a las condiciones del control (EtOH).

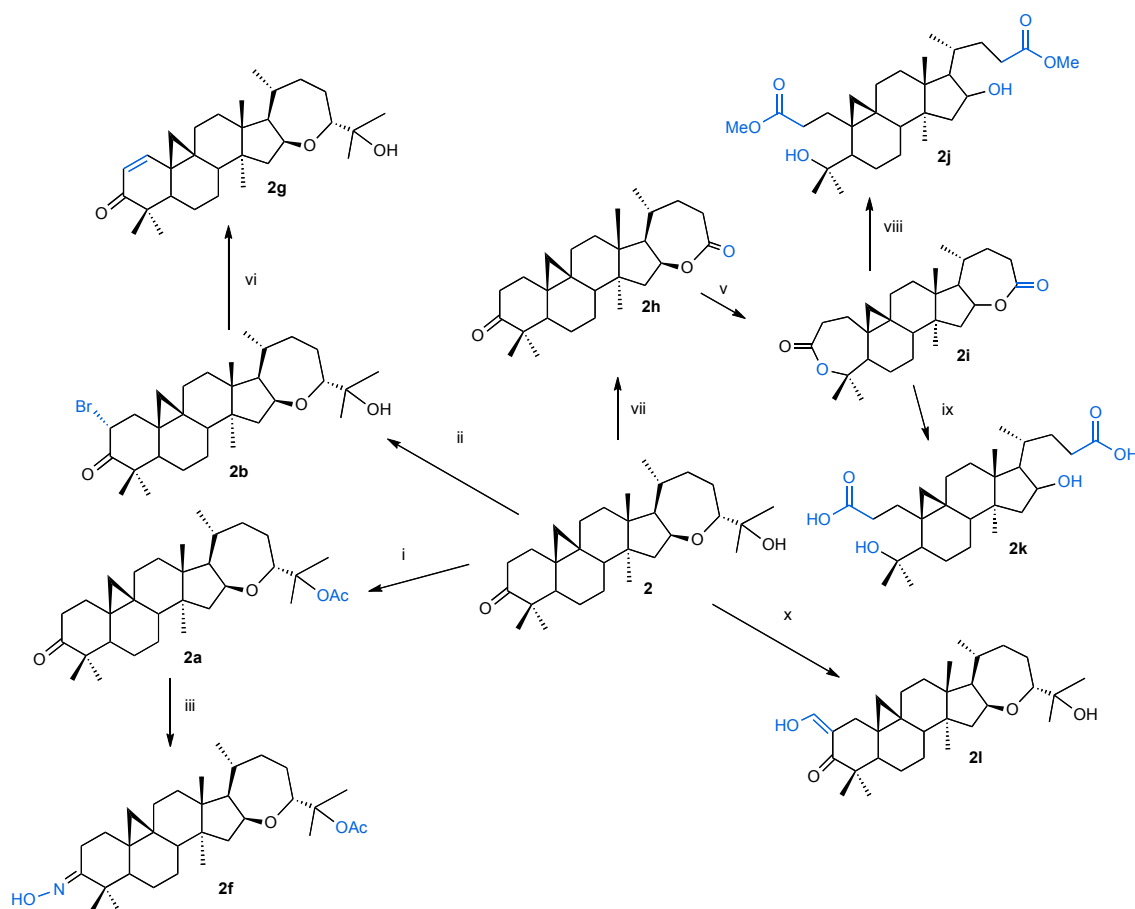
Con el fin de comprender mejor el mecanismo de **2**, se analizó el ciclo celular de células RKO después del tratamiento con diferentes dosis de argentinina B (**2**) para 24 y 48 h. Para ambos tiempos, los resultados mostraron que la proporción de células en la fase  $G_0/G_1$  aumentó de una manera dependiente de la dosis acompañada por disminuciones simultáneas de células en las fases S y  $G_2/M$  (Figura 41A y 41C). Los datos mostraron que los porcentajes de células en las fases  $G_2/M$  y S disminuyeron significativamente tras el

tratamiento de células RKO con 15, 25 y 35  $\mu\text{M}$  de argentatina B (**2**), en comparación con el grupo control (Figura 41B y 41D). La reducción en la síntesis de ADN indicó interferencia con la entrada de las células en la fase S, y por lo tanto debe coincidir con una acumulación de células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Agentes antiproliferativos fisiológicos pueden bloquear el ciclo celular, siempre y cuando se añaden a las células antes de la iniciación de la fase S. Se ha postulado que la reducción en la síntesis de ADN indica interferencia con la entrada de las células en la fase S, y por lo tanto debe coincidir con una acumulación de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular. Efectos similares se han observado en glucósidos de triterpenoides de tipo cicloartano aislados en varias plantas medicinales, aunque la diferencia es que **2** es capaz de inhibir en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Tian et al., 2005b; Wong et al., 2012).



**Figura 41.** Análisis del ciclo celular. Células RKO expuestas a 15, 25, 35 y 45  $\mu\text{M}$  de **2** durante 24 h **A**) y 48h. **C**). Histogramas representativos de cada concentración de **2** durante 24 h **B**) y **D**) 48h). Porcentaje de células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (barras negras), S (barras grises) y G<sub>2</sub>/M (barras blancas), para 24h y 48h. Los datos representan la media  $\pm$  EEM, n = 6.

Con el fin de conocer cuáles son los requisitos estructurales necesarios para la actividad citotóxica y la detención del ciclo celular inducida por **2**, decidimos obtener los 7 derivados **2f-2l** a partir de la argentatina B por medio de transformaciones químicas ver Figura 42 y evaluarlos tanto en el ensayo FMCA como en la prueba del ciclo celular.



**Figura 42.** Derivados de la argentatina B (**2**) **2f-2l**. Condiciones de reacción y rendimiento (i)  $\text{AcONa}/(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , 86.1%; (ii)  $\text{Br}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$ , 64.3%; (iii)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 87.1%; (iv)  $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 54%; (v)  $m\text{-CPBA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 92%; (vi)  $\text{CrO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ , 58.22%; (viii)  $\text{MeOH}$ ,  $\text{KOH}$ , 61.2%; (ix)  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KOH}$ , 52.1%; (x)  $\text{HCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ,  $\text{Na}/\text{MeOH}$ , 71%.

El tratamiento del acetato **2a** con clorhidrato de hidroxilamina y piridina, permitió la obtención de la oxima **2f** con un 86.1 % de rendimiento. El espectro



de IR de **2f**, presenta la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo del precursor **2a**. En el espectro de masas, se observó la presencia de un pico de  $m/z$  513 que corresponde al ión molecular esperado para el derivado. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa el desplazamiento a campo alto (con respecto a **2a**), de la señal asociada al C-3, debido a la pérdida del carbonilo y la generación del enlace C=N.

Para la obtención del derivado **2g**, se hizo reaccionar el bromo derivado **2b** con carbonato de calcio y diacetilamida. Dicho producto se obtuvo con un rendimiento del 87.1%. En el espectro de IR de **2g**, se observa una banda intensa a  $1663.29\text{ cm}^{-1}$  que evidencia la presencia de un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. En el espectro de masas se observa un pico de  $m/z$  454 que corresponde al ión molecular del compuesto **2g**. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observa la aparición de dos dobletes a 5.95 y 6.78 ppm ( $J=10\text{ Hz}$ ) correspondientes a los hidrógenos de la posición 2 y 1, respectivamente. Por otro lado, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan dos señales de carbonos  $\text{sp}^2$  a 153.68 y 126.77 ppm.

La reacción de **2** con  $\text{CrO}_3$  en ácido acético produjo el derivado **2h**. En el espectro de IR se observa, entre otras, la presencia de dos señales intensas a 1730 y  $1701\text{ cm}^{-1}$  asociadas a la presencia de un carbonilo en un éster (lactona) y un carbonilo en una cetona cíclica de seis miembros. El espectro de masas de **2h**, muestra un pico de  $m/z$  412, que corresponde al ión molecular de dicho derivado. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observa la pérdida de las señales de hidrógenos de dos grupos metilo, así como la señal del hidrógeno en C-24.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa también la pérdida de tres átomos de carbono y el desplazamiento del C24 a campo bajo (con respecto a la argentatina B) 174.1 ppm.

La lactona **2h** fue tratada con ácido m-cloro peroxibenzoico en diclorometano para dar la dilactona **2i** con un rendimiento del 92 %. En el espectro de IR se observa la presencia de dos señales a 1726 y 1718  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a la presencia de los carbonilos en cada ester (lactonas). El espectro de masas muestra un pico m/z 428 que corresponde al ion molecular de este derivado.

Los compuestos **2j** y **2k** se obtuvieron producto de la reacción de **2** con hidróxido de potasio en presencia de MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$  respectivamente, los espectros de masas muestran un pico m/z 464 y 429 respectivamente que corresponde al ion molecular de estos derivados.

La obtención del derivado **2l** se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Clinton y cols., (1961). Dicha reacción consistió en la generación *in situ* del enol y la alquilación en C-2 de la argentatina B, por medio de una solución de Na/MeOH y formiato de etilo. El espectro de masas del derivado **2l** muestra un pico de m/z 484 que corresponde al ión molecular esperado. El espectro de IR muestra dos señales a 1635.1 y 1586.9  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al sistema conjugado  $\beta$  dicarbonílico. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observa una señal a 8.67 ppm y otra a 14.84 ppm. Esta última desaparece después de la adición de  $\text{D}_2\text{O}$ , lo que indica la presencia de un alcohol, posiblemente enol quelatado. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , se observa presencia de tres carbonos  $\text{sp}^2$ , de los

cuales, dos son cuaternarios y uno es terciario, con lo anterior se evidencia la presencia de una forma tautomérica de la  $\beta$  dicetona.

Utilizando el ensayo de FCMA se determinaron los valores de  $IC_{50}$  para **2a-2l**, de la misma manera que se calculó para **2**. Ver tabla 9.

**Tabla 9.** Valores de  $CI_{50}$  para **2** y los derivados **2a-2l** medida por FCMA

Compuesto	$CI_{50} \pm EEM$ ( $\mu M$ )
2	$25.04 \pm 0.38$
2a	$82.08 \pm 0.89$
2b	$22.04 \pm 0.38$
2c	$49.84 \pm 0.57$
2d	> 100
2e	> 100
2f	$70.52 \pm 0.75$
2g	$23.80 \pm 0.31$
2h	> 100
2i	$44.95 \pm 0.34$
2j	$84.13 \pm 0.02$
2k	$98.99 \pm 0.03$
2l	$31.13 \pm 0.28$
EtOH	-
Doxorrubicina	$2.23 \pm 0.02$

Los valores representan la media  $\pm$  EEM, de tres experimentos independientes con dos repeticiones

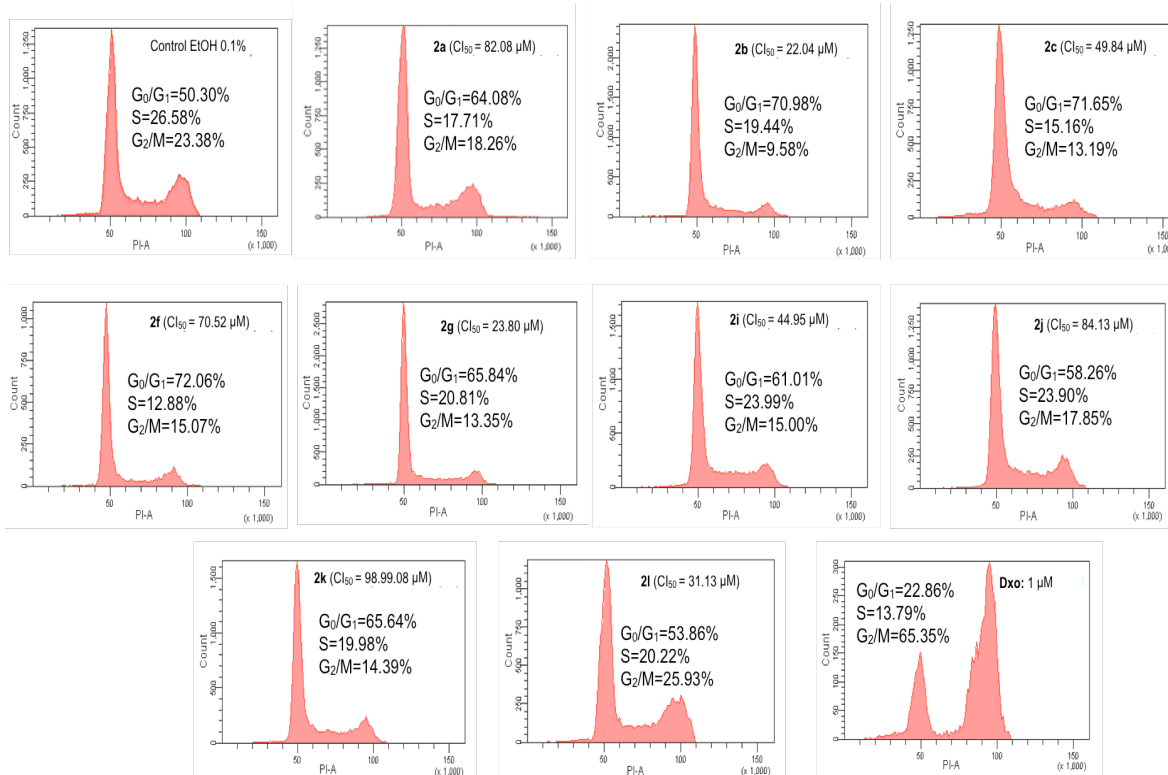
Los derivados de **2b** y **2g** tienen una  $IC_{50}$  de menor a la de la argentatina B. Los compuestos **2c**, **2l** y **2i** tienen una  $IC_{50}$  mayor que **2**, pero menor de  $50 \mu M$ , mientras que **2a**, **2f**, **2j** y **2k** por debajo de  $100 \mu M$ , sin embargo para **2d**, **2e** y **2h**, esta es mayor a  $100 \mu M$ . Teniendo en cuenta estos efectos sobre la viabilidad celular, **2d**, **2e** y **2h**, se omitieron para estudios posteriores.

Las células RKO se expusieron a los compuestos elegidos a la  $Cl_{50}$  durante 24 h, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo para determinar la distribución total de la población en las diferentes fases ( $G_0/G_1$ , S, y  $G_2/M$ ). Sin embargo, en las mismas condiciones, el tratamiento de células RKO con el compuesto **2I** no mostró diferencias en comparación con el control de EtOH. Cuando las células RKO se trataron con los compuestos **2a**, **2g**, **2i**, **2j** y **2k**, condujo al enriquecimiento de la población de células  $G_0/G_1$ , de manera similar al efecto de **2**, se observó un aumento estadísticamente significativo en comparación con el control. Sin embargo, para S y  $G_2/M$  fase existe una disminución de la población celular como se muestra en la tabla 10 y Figura 43.

**Tabla 10.** Valores de inducción de arresto del ciclo celular de **2** y sus derivados **2a-2I** en células RKO expuestas por 24 horas a la  $Cl_{50}$

Compuesto	Arresto del ciclo celular <sup>a</sup>		
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
	%	%	%
2	62.83 ± 1.45 <sup>***</sup>	20.43 ± 1.14 <sup>**</sup>	16.74 ± 0.30 <sup>***</sup>
2a	64.08 ± 2.32 <sup>***</sup>	17.71 ± 3.76 <sup>***</sup>	18.26 ± 3.12 <sup>***</sup>
2b	70.98 ± 4.31 <sup>***</sup>	19.44 ± 4.06 <sup>***</sup>	9.58 ± 0.79 <sup>***</sup>
2c	71.65 ± 2.60 <sup>***</sup>	15.16 ± 3.53 <sup>***</sup>	13.19 ± 1.29 <sup>***</sup>
2d	ND	ND	ND
2e	ND	ND	ND
2f	72.06 ± 4.26 <sup>***</sup>	12.88 ± 3.15 <sup>***</sup>	15.07 ± 1.75 <sup>***</sup>
2g	65.84 ± 3.29 <sup>***</sup>	20.81 ± 3.68 <sup>**</sup>	13.35 ± 2.25 <sup>***</sup>
2h	ND	ND	ND
2i	61.01 ± 2.49 <sup>***</sup>	23.99 ± 1.63	15.00 ± 1.90 <sup>***</sup>
2j	58.26 ± 1.44 <sup>***</sup>	23.90 ± 2.14	17.85 ± 1.29 <sup>***</sup>
2k	65.64 ± 1.86 <sup>***</sup>	19.98 ± 0.64 <sup>**</sup>	14.39 ± 2.22 <sup>***</sup>
2l	53.86 ± 4.29	20.22 ± 3.67 <sup>**</sup>	25.93 ± 3.05
EtOH	50.30 ± 2.84	26.58 ± 3.67	23.38 ± 2.36
Doxorrubicina	22.86 ± 3.59 <sup>***</sup>	13.79 ± 27.72 <sup>**</sup>	65.35 ± 5.77 <sup>***</sup>

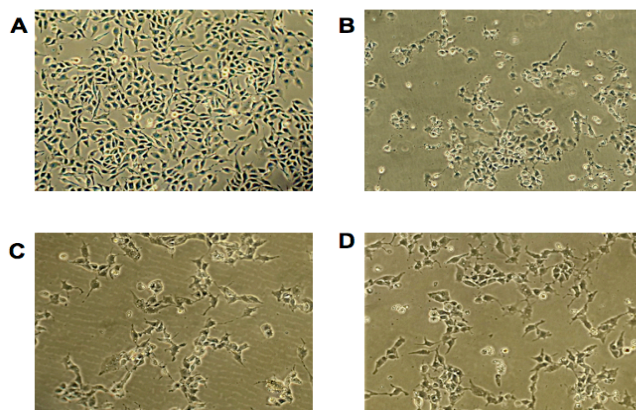
<sup>a</sup> Los valores representan la media ± EEM, n = 6. \*\* P <0,01 y \*\*\* P <0,001 diferencia significativa en cada fase del ciclo celular en comparación con el EtOH analizados con ANOVA y el post test de Dunnett. ND no determinado.



**Figura 43.** Efecto en el ciclo celular de la Cl<sub>50</sub> de los derivados de la argentatina B (**2**) **2a-2l** sobre células RKO expuestas durante 24 h. Los histogramas son los más representativos de tres experimentos independientes. Se muestran los porcentajes de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Mientras que en los compuestos **2b**, **2c** y **2f** de la detención en la fase G<sub>0</sub>/ fase G<sub>1</sub> fue mayor. El compuesto **2c** (50 μM) provocó una detención más evidente en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> con 50,3% para el control a 72,0% para las células tratadas, mientras que una disminución de células en S y G<sub>2</sub>/M fases se observó, en G<sub>2</sub>/M disminuyó significativamente de 23,4% para el control a 13,0% para las células tratadas, mientras que también aumenta para el derivado **2f** a 72% de la detención de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y la disminución de células en G<sub>2</sub>/M a 15% (Figura 43). Los resultados mostraron que las modificaciones químicas que se realizaron para obtener derivados de **2b**, **2c** y **2f**, permitieron obtener tres

nuevos fármacos citostáticos con mayor efecto inhibitorio del ciclo celular que la molécula original. Los efectos morfológicos de los derivados más activos en células RKO se puede ver en la Figura 44.



**Figura 44.** Cambios morfológicos de las células RKO después del tratamiento con los derivados más citostáticos de **2**. Las células fueron tratadas A) Etanol 0,1% y la  $CI_{50}$  de los derivados B) **2b**, C) **2f** y D) **2c**. Magnificación: 40X

En el tratamiento del cáncer, la muerte celular es un factor importante que influye en el número de células y la susceptibilidad a la transformación neoplásica, así como la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Otras estrategias convencionales utilizados en la quimioterapia del cáncer están impidiendo la síntesis de ADN o la mitosis mediante el bloqueo de la progresión del ciclo celular en las células pre-neoplásicas o malignas. La mayoría de los tumores de células retienen la capacidad de mantener la detención del crecimiento permanente o someterse a tipos no apoptóticos de muerte celular, podría por lo tanto ser posible explotar estas propiedades para inducir la muerte de células tumores por medios no apoptóticos y para confundir a la supervivencia de clones fármaco-resistentes (Blagosklonny, 2004). Nuestros compuestos se pueden usar para este propósito. Además, la combinación de

fármacos puede ser predominantemente citotóxica para las células cancerosas, porque estas células son resistentes a la detención del crecimiento, serán necesarios ensayos posteriores para determinar si el uso de nuestros derivados citostáticos de la argentatina B aumentan el efecto de otros agentes citotóxicos.

En contraste, los derivados **2c** y **2f**, mostraron una actividad muy baja en el ensayo FCMA, sin embargo ambos indujeron un efecto significativo en la prueba del ciclo celular, de la misma manera que **2j** y **2k**. Aunque nuestros resultados mostraron que no hay correlación entre los resultados del ensayo FMCA y los de la prueba de inhibición del ciclo celular, es probable que una disfunción de la elastasa junto con una anomalía en el ciclo celular tanto inducida por los compuestos **2**, **2b** y **2g** y **2l**, podría conducir a la muerte celular.

## 7. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados muestran que las argentatinas A (**1**), B (**2**) y D (**3**) poseen actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA en la oreja de ratones.
- Se evaluó la actividad anti-inflamatoria de 13 derivados de las argentatinas A y B, **2** y el 25-nor-cycloart-3,16-diona-17-en-24-oico (**1h**) fueron los compuestos más activos.
- La argentatina B (**2**) a 30  $\mu$ M mostró un 78,77% de inhibición de la actividad de COX-2.
- Estudios de acoplamiento sugieren que **2** interactúa con Arg 120, un residuo clave para la actividad de COX-2, este modelo esta razonablemente de acuerdo con las propiedades antiinflamatorias observadas de **2**.
- La argentatina B (**2**) afecta gravemente a las células RKO y causó una disminución del índice mitótico y una ligera disminución en la tasa de replicación inducida por **2** en células RKO.
- La argentatina B (**2**) induce la detención del ciclo celular en la línea RKO medido por citometría de flujo.



- Se evaluó 10 derivados de **2** tanto en el ensayo FMAC y también como agentes inhibidores del ciclo celular, los derivados más activos fueron 3-oxima-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2c**] y 25-O-acetil-3-oxima-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan [**2f**].

## 8. REFERENCIAS

Alfonso, L.; Ai, G.; Spitale, R. C.; Bhat, G. J. Molecular Targets of Aspirin and Cancer Prevention. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 61–67.

Von Angerer, E.; Kager, M.; Maucher, a. Antitumour Activity of Coumarin in Prostate and Mammary Cancer Models. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, S14–S16.

Anto, R. J.; Mukhopadhyay, A.; Denning, K.; Aggarwal, B. B. Curcumin (diferuloylmethane) Induces Apoptosis through Activation of Caspase-8, BID Cleavage and Cytochrome c Release: Its Suppression by Ectopic Expression of Bcl-2 and Bcl-XI. *Carcinogenesis* **2002a**, *23*, 143–150.

Anto, R. J.; Mukhopadhyay, A.; Denning, K.; Aggarwal, B. B.; Agostini, F. D.; Izzotti, A.; Balansky, R. M.; Bennicelli, C.; Flora, S. De; Khaw, A. K.; et al. Curcumin (diferuloylmethane) Induces Apoptosis through Activation of Caspase-8, BID Cleavage and Cytochrome c Release: Its Suppression by Ectopic Expression of Bcl-2 and Bcl-XI. *Mutat. Res.* **2002b**, *23*, 143–150.

Asghar, U.; Witkiewicz, A. K.; Turner, N. C.; Knudsen, E. S. The History and Future of Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Cancer Therapy. *Nat. Publ. Gr.* **2015**, *14*, 130–146.

Balkwill, F. R.; Mantovani, A. Cancer-Related Inflammation: Common Themes and Therapeutic Opportunities. *Semin. Cancer Biol.* **2012a**, *22*, 33–40.

Balkwill, F. R.; Mantovani, A. Cancer-Related Inflammation: Common Themes and Therapeutic Opportunities. *Semin. Cancer Biol.* **2012b**, *22*, 33–40.

Balkwill, F.; Mantovani, A. Cancer and Inflammation: Implications for Pharmacology and Therapeutics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 401–406.

Behl, C.; Ziegler, C. *Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease*; Springer Berlin Heidelberg: London, 2014.

Bhalla, K. N. Microtubule-Targeted Anticancer Agents and Apoptosis. *Oncogene* **2003**, *22*, 9075–9086.

Bhanot, A.; Sharma, R.; Noolvi, M. N. Natural Sources as Potential Anti-Cancer Agents : A Review. *Int. J. Phytomedicine* **2011**, *3*, 9–26.

Bishayee, A.; Ahmed, S.; Brankov, N.; Perloff, M. Triterpenoids as Potential Agents for the Chemoprevention and Therapy of Breast Cancer. *Front Biosci* **2011**, *16*, 980–996.

Blagosklonny, M. V. Prospective Strategies to Enforce Selectively Cell Death in Cancer Cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 2967–2975.

Brennecke, P.; Allavena, P.; Laface, I.; Mantovani, A.; Bottazzi, B. Inflammatory and Innate Immune Cells in Cancer Microenvironment and Progression. In *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context*; Rezaei, N., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2015; pp. 9–28.

Chan, K.-S.; Koh, C.-G.; Li, H.-Y. Mitosis-Targeted Anti-Cancer Therapies: Where They Stand. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e411.

Cheok, C. F.; Dey, A.; Lane, D. P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Sensitize Tumor Cells to Nutlin-Induced Apoptosis: A Potent Drug Combination. *Mol. Cancer Res.* **2007**, *5*, 1133–1145.

Colburn, W. a. Optimizing the Use of Biomarkers, Surrogate Endpoints, and Clinical Endpoints for More Efficient Drug Development. *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *40*, 1419–1427.

Collins, I.; Garrett, M. D. Targeting the Cell Division Cycle in Cancer: CDK and Cell Cycle Checkpoint Kinase Inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 366–373.

Collins, I.; Workman, P. New Approaches to Molecular Cancer Therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 689–700.

Coussens, L. M.; Zitvogel, L.; Palucka, a. K. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science (80-. ).* **2013**, *339*, 286–291.

Cragg, G. M.; Newman, D. J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72–79.

Cragg, G. M.; Newman, D. J. Nature: A Vital Source of Leads for Anticancer Drug Development. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 313–331.

Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **2013a**, *1830*, 3670–3695.

Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta* **2013b**, *1830*, 3670–3695.

Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Yang, S. S. Natural Product Extracts of Plant and Marine Origin Having Antileukemia Potential. The NCI Experience. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 488–498.

Cryer, B.; Feldman, M. Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 Selectivity of Widely Used Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Am. J. Med.* **1998**, *104*, 413–421.

Csoka, K.; Rolf, L.; Rholander, B.; Gerdin, E.; De la Torre, M.; Nygren, P. Cytotoxic Drug Sensitivity Testing of Tumor Cells from Patient With Ovarian

Carcinoma Using the Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA). *Gynecol. Oncol.* **1994**, *54*, 163–170.

Cuzick, J.; Otto, F.; Baron, J. a; Brown, P. H.; Burn, J.; Greenwald, P.; Jankowski, J.; La Vecchia, C.; Meyskens, F.; Senn, H. J.; et al. Aspirin and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Cancer Prevention: An International Consensus Statement. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 501–507.

Diaz-Padilla, I.; Siu, L. L.; Duran, I. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Potential Targeted Anticancer Agents. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 586–594.

Dirsch, V. M.; Stuppner, H.; Vollmar, A. M. The Griess Assay: Suitable for a Bio-Guided Fractionation of Anti-Inflammatory Plant Extracts? *Planta Med.* **1998**, *64*, 423–426.

Domínguez, X. Aspectos Químicos Del Guayule. *Guayule, Reencuentro en el Desierto*, E. Campos-Lopez, ed., Conacyt, Mex. **1978**.

Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Pharmacological Activities of Natural Triterpenoids and Their Therapeutic Implications. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394–411.

Feldman, M.; McMahon, A. T. Do Cyclooxygenase-2 Inhibitors Provide Benefits Similar to Those of Traditional Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, with Less Gastrointestinal Toxicity? *Ann. Intern. Med.* **2000**, *132*, 134–143.

Ferlay, J.; Shin, H.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2013.

Garrett, M. M. D.; Fattaey, A. CDK Inhibition and Cancer Therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, *9*, 104–111.

Gijón, M. A.; Leslie, C. C. Phospholipases A 2. In *Seminars in cell & developmental biology*; Elsevier, 1997; Vol. 8, pp. 297–303.

De Gramont, A.; Watson, S.; Ellis, L. M.; Rodón, J.; Tabernero, J.; de Gramont, A.; Hamilton, S. R. Pragmatic Issues in Biomarker Evaluation for Targeted Therapies in Cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, 1–16.

Greene, E. R.; Huang, S.; Serhan, C. N.; Panigrahy, D. Regulation of Inflammation in Cancer by Eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2011**, *96*, 27–36.

Greenhough, A.; Smartt, H. J. M.; Moore, A. E.; Roberts, H. R.; Williams, A. C.; Paraskeva, C.; Kaidi, A. The COX-2/PGE2 Pathway: Key Roles in the Hallmarks of Cancer and Adaptation to the Tumour Microenvironment. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 377–386.

- Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899.
- Hammond, B. L.; Polhamus, L. G. *Research on Guayule (Parthenium Argentatum), 1942-1959*; US Department of Agriculture, 1965.
- Hanahan, D.; Weinberg, R. a. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- Hanon, E.; Vanderplasschen, A.; Pastoret, P. The Use of Flow Cytometry for Concomitant Detection of Apoptosis and Cell Cycle Analysis. *Biochemica* **1996**, *2*, 25–27.
- Hawkey, C. J. COX-2 Inhibitors. *Lancet* **1999**, *353*, 307–314.
- Hawley, T. S.; Hawley, R. G.; Givan, A. L. Flow Cytometry Protocols Volume 263. In *Methods in Molecular Biology*; Hawley, T. S.; Hawley, R. G., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2004; Vol. 263, p. 425.
- Hennenfent, K. L.; Govindan, R. Novel Formulations of Taxanes: A Review. Old Wine in a New Bottle? *Ann. Oncol.* **2006**, *17*, 735–749.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. MICROTUBULES AS A TARGET FOR. **2004**, *4*.
- Kastan, M. B.; Bartek, J. Cell-Cycle Checkpoints and Cancer. *Nature* **2004**, *432*, 316–323.
- Keen, N.; Taylor, S. Mitotic Drivers--Inhibitors of the Aurora B Kinase. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 185–195.
- Khaw, A. K.; Hande, M. P.; Kalthur, G.; Hande, M. P. Curcumin Inhibits Telomerase and Induces Telomere Shortening and Apoptosis in Brain Tumour Cells. *J. Cell. Biochem.* **2012**, n/a – n/a.
- Kintzios, S. E. Terrestrial Plant-Derived Anticancer Agents and Plant Species Used in Anticancer Research. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **2006**, *25*, 79–113.
- Komoroski, R. A.; Gregg, E. C.; Shockcor, J. P.; Geckle, J. M. Identification of Guayule Triterpenes by Two-Dimensional and Multipulse NMR Techniques. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 534–543.
- Kops, G. J. P. L.; Weaver, B. a a; Cleveland, D. W. On the Road to Cancer: Aneuploidy and the Mitotic Checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 773–785.
- Lapenna, S.; Giordano, A. Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 547–566.
- Larsson, R.; Nygren, P. Laboratory Prediction of Clinical Chemotherapeutic Drug Resistance: A Working Model Exemplified by Acute Leukaemia. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29*, 1208–1212.

Lavhale, M. S.; Kumar, S.; Mishra, S. H.; Sitasawad, S. L. A Novel Triterpenoid Isolated from the Root Bark of *Ailanthus Excelsa* Roxb (Tree of Heaven), AECHL-1 as a Potential Anti-Cancer Agent. *PLoS One* **2009**, *4*, e5365.

Lee, D. H.; Thoennissen, N. H.; Goff, C.; Iwanski, G. B.; Forscher, C.; Doan, N. B.; Said, J. W.; Koeffler, H. P. Synergistic Effect of Low-Dose Cucurbitacin B and Low-Dose Methotrexate for Treatment of Human Osteosarcoma. *Cancer Lett.* **2011**, *306*, 161–170.

Lee, D. Y.; Noh, H. J.; Choi, J.; Lee, K. H.; Lee, M. H.; Lee, J. H.; Hong, Y.; Lee, S. E.; Kim, S. Y.; Kim, G. S. Anti-Inflammatory Cycloartane-Type Saponins of *Astragalus Membranaceus*. *Molecules* **2013**, *18*, 3725–3732.

Lewinska, A.; Wnuk, M.; Grabowska, W.; Zabek, T.; Semik, E.; Sikora, E.; Bielak-Zmijewska, A. Curcumin Induces Oxidation-Dependent Cell Cycle Arrest Mediated by SIRT7 Inhibition of rDNA Transcription in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Toxicol. Lett.* **2015**, *233*, 227–238.

Li, J.; Guo, W.-J.; Yang, Q.-Y. Effects of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on Human Colon Carcinoma Cell Line HCT15. *World J. Gastroenterol.* **2002**, *8*, 493–495.

Li, J.; Liu, D.; Sun, L.; Lu, Y.; Zhang, Z. Advanced Glycation End Products and Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Perspective. *J. Neurol. Sci.* **2012**, *317*, 1–5.

Lin, Y.; Bai, L.; Chen, W.; Xu, S. The NF- $\kappa$ B Activation Pathways, Emerging Molecular Targets for Cancer Prevention and Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 45–55.

Lindhagen, E.; Nygren, P.; Larsson, R. The Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1364–1369.

Lukas, J.; Lukas, C.; Bartek, J. Mammalian Cell Cycle Checkpoints: Signalling Pathways and Their Organization in Space and Time. *DNA Repair (Amst)*. **2004**, *3*, 997–1007.

Malumbres, M.; Barbacid, M. Mammalian Cyclin-Dependent Kinases. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 630–641.

Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 153–166.

Malumbres, M.; Pevarello, P.; Barbacid, M.; Bischoff, J. R. CDK Inhibitors in Cancer Therapy: What Is Next? *Trends Pharmacol. Sci.* **2008a**, *29*, 16–21.

Malumbres, M.; Pevarello, P.; Barbacid, M.; Bischoff, J. R. CDK Inhibitors in Cancer Therapy: What Is Next? *Trends Pharmacol. Sci.* **2008b**, *29*, 16–21.

Mantovani, A.; Mantovani, A.; Allavena, P.; Allavena, P.; Sica, A.; Sica, A.; Balkwill, F.; Balkwill, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436–444.

Martínez, R.; Martínez-Vázquez, M.; Zamorano-Macías, O. Electron Impact Mass Spectrometry of Triterpenoids from Guayule. *Org. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 445–450.

Masferrer, J. L.; Leahy, K. M.; Koki, A. T.; Zweifel, B. S.; Settle, S. L.; Woerner, B. M.; Edwards, D. a; Flickinger, A. G.; Moore, R. J.; Seibert, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *2000*, 1306–1311.

Medina-Franco, J. L.; Martínez-Mayorga, K.; Peppard, T. L.; Del Rio, A. Chemoinformatic Analysis of GRAS (Generally Recognized as Safe) Flavor Chemicals and Natural Products. *PLoS One* **2012**, *7*.

Medina-Franco, J. L.; Giulianotti, M. A.; Welmaker, G. S.; Houghten, R. A. Shifting from the Single to the Multitarget Paradigm in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 495–501.

Méric, J.-B.; Rottey, S.; Olausson, K.; Soria, J.-C.; Khayat, D.; Rixe, O.; Spano, J.-P. Cyclooxygenase-2 as a Target for Anticancer Drug Development. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2006**, *59*, 51–64.

Moore, M. M.; Chua, W.; Charles, K. A.; Clarke, S. J. Inflammation and Cancer: Causes and Consequences. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010a**, *87*, 504–508.

Moore, M. M.; Chua, W.; Charles, K. a; Clarke, S. J. Inflammation and Cancer: Causes and Consequences. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010b**, *87*, 504–508.

Muller, W. A. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Lab. Investig.* **2002**, *82*, 521–534.

Nadinic, E.; Gorzalczany, S.; Rojo, A.; van Baren, C.; Debenedetti, S.; Acevedo, C. Topical Anti-Inflammatory Activity of *Gentianella Achalensis*. *Fitoterapia* **1999**, *70*, 166–171.

Nagle, A.; Hur, W.; Gray, N. S. Antimitotic Agents of Natural Origin. *Curr. Drug Targets* **2006**, *7*, 305–326.

Nathan, C. Points of Control in Inflammation. *Nature* **2002**, *420*, 846–852.

Ohshima, H.; Tazawa, H.; Sylla, B.; Sawa, T. Prevention of Human Cancer by Modulation of Chronic Inflammatory Processes. *Mutat. Res. ...* **2005**, *591*, 110–122.

Orzáez, M.; Gortat, A.; Mondragón, L.; Bachs, O.; Pérez-Payá, E. ATP-Noncompetitive Inhibitors of CDK-Cyclin Complexes. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 19–24.

Oviedo-Chavez, I.; Apan, T. R.; Martínez-Vázquez, M. Cytotoxic Activity and Effect on Nitric Oxide Production of Tirucallane-Type Triterpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 1087–1091.

Oviedo-Chávez, I.; Ramírez-Apan, T.; Soto-Hernández, M.; Martínez-Vázquez, M. Principles of the Bark of *Amphipterygium Adstringens* (Julianaceae) with Anti-Inflammatory Activity. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 436–445.

Park, E.-J.; Kwon, H.-K.; Choi, Y.-M.; Shin, H.-J.; Choi, S. Doxorubicin Induces Cytotoxicity through Upregulation of Perk-dependent ATF3. *PLoS One* **2012**, *7*, e44990.

Park, H. J.; Kim, M.-J.; Ha, E.; Chung, J.-H. Apoptotic Effect of Hesperidin through caspase3 Activation in Human Colon Cancer Cells, SNU-C4. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 147–151.

Park, M.-T.; Lee, S.-J. Cell Cycle and Cancer. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *36*, 60–65141.

Parra-Delgado, H.; García-Pillado, F.; Sordo, M.; Ramírez-Apan, T.; Martínez-Vázquez, M.; Ostrosky-Wegman, P. Evaluation of the Cytotoxicity, Cytostaticity and Genotoxicity of Argentatins A and B from *Parthenium Argentatum* (Gray). *Life Sci.* **2005**, *77*, 2855–2865.

Parra-Delgado, H.; Compadre, C. M.; Ramírez-Apan, T.; Muñoz-Fambuena, M. J.; Compadre, R. L.; Ostrosky-Wegman, P.; Martínez-Vázquez, M. Synthesis and Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) of Argentatin B Derivatives as Growth Inhibitors of Human Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1889–1901.

Perry, P.; Wolff, S. New Giemsa Method for the Differential Staining of Sister Chromatids. *Nature* **1974**, *251*, 156–158.

Ponder, B. a. Cancer Genetics. *Nature* **2001**, *411*, 336–341.

Pozarowski, P.; Darzynkiewicz, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. In *Methods in molecular biology, col. 281: Checkpoint Controls and Cancer*; Schönthal, A., Ed.; Humana Press Inc: Totowa, NJ, 2004; Vol. 281, pp. 301–311.

Prawat, U.; Chairerk, O.; Lenthas, R.; Salae, A.-W.; Tuntiwachwuttikul, P. Two New Cycloartane-Type Triterpenoids and One New Flavanone from the Leaves of *Dasymaschalon Dasymaschalum* and Their Biological Activity. *Phytochem. Lett.* **2013**, *6*, 286–290.

Pudhom, K.; Nuanyai, T.; Matsubara, K. Cytotoxic and Anti-Angiogenic Properties of Minor 3,4-Seco-Cycloartanes from *Gardenia Sootepensis* Exudate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2012**, *60*, 1538–1543.



Ramachandran, C.; Rabi, T.; Fonseca, H. B.; Melnick, S. J.; Escalon, E. a. Novel Plant Triterpenoid Drug Amooranin Overcomes Multidrug Resistance in Human Leukemia and Colon Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 784–789.

Ren, S.; Rollins, B. J. Cyclin C/Cdk3 Promotes Rb-Dependent G0 Exit. *Cell* **2004**, *117*, 239–251.

Robert, J. Textbook of Cell Signalling in Cancer. **2015**, 203–219.

Rodriguez-Hahn, L.; Romo de Vivar, A.; Ortega, A.; Aguilar, M.; Romo, J. Determinación de Las Estructuras de Las Argentinas A,B Y C Del Guayule. *Rev. Latinoam. Química* **1970**, *1*, 24–38.

Rojas, E.; Herrera, L. A.; Sordo, M.; Gonsebatt, M. E.; Montero, R.; Rodriguez, R.; Ostrosky-Wegman, P. Mitotic Index and Cell Proliferation Kinetics for Identification of Antineoplastic Activity. *Anticancer Drugs* **1993**, *4*, 637–640.

Rollins, R. C. The Guayule Rubber Plant and Its Relatives. *Contrib. from Gray Herb. Harvard Univ.* **1950**, 1–72.

Romo de Vivar, A.; Martínez-Vázquez, M.; Matsubara, C.; Perez-Sanchez, G.; Joseph-Nathan, P. Triterpenes in *Parthenium Argentatum*, Structures of Argentatins C And D. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 915–918.

Roy, M. K.; Kobori, M.; Takenaka, M.; Nakahara, K.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. Inhibition of Colon Cancer (HT-29) Cell Proliferation by a Triterpenoid Isolated from *Azadirachta Indica* Is Accompanied by Cell Cycle Arrest and up-Regulation of p21. *Planta Med.* **2006**, *72*, 917–923.

Sadeghi-Aliabadi, H.; Minaiyan, M.; Dabestan, A. Cytotoxic Evaluation of Doxorubicin in Combination with Simvastatin against Human Cancer Cells. *Res. Pharm. Sci.* **2010**, *5*, 127.

Salazar, J. R.; Martínez-Vazquez, M.; Cespedes, C. L.; Ramírez-Apan, T.; Nieto-Camacho, A.; Rodríguez-Silverio, J.; Flores-Murrieta, F. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichipegenin, Peniocerol, and Macdougallin Isolated from *Myrtillocactus Geometrizans* (Mart. Ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2011**, *66 C*, 24–30.

Salminen, a.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K.; Huuskonen, J. Terpenoids: Natural Inhibitors of NF- $\kappa$ B Signaling with Anti-Inflammatory and Anticancer Potential. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2979–2999.

Sandjo, L. P.; Rincheval, V.; Ngadjui, B. T.; Kirsch, G. Cytotoxic Effect of Some Pentacyclic Triterpenes and Hemisynthetic Derivatives of Stigmasterol. *Chem. Nat. Compd.* **2011**, *47*, 731–734.

Schloman, W. W.; Hively, R. A.; Krishen, A.; Andrews, A. M. Guayule Byproduct Evaluation: Extract Characterization. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 873–876.

Senese, S.; Lo, Y. C.; Huang, D.; Zangle, T. a; Gholkar, a a; Robert, L.; Homet, B.; Ribas, a; Summers, M. K.; Teitell, M. a; et al. Chemical Dissection of the Cell Cycle: Probes for Cell Biology and Anti-Cancer Drug Development. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1462.

Shah, M. A.; Schwartz, G. K. Cyclin Dependent Kinases as Targets for Cancer Therapy. *Update Cancer Ther.* **2006**, *1*, 311–332.

Sherr, C. J. Cancer Cell Cycles. *Science (80- )*. **1996**, *274*, 1672–1677.

Sherr, C. J.; McCormick, F. The RB and p53 Pathways in Cancer. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 103–112.

Sridhar, J.; Akula, N.; Pattabiraman, N. Selectivity and Potency of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *AAPS J.* **2006**, *8*, E204–E221.

Srinivas, G.; Anto, R. J.; Srinivas, P.; Vidhyalakshmi, S.; Senan, V. P.; Karunagaran, D. Emodin Induces Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells through poly(ADP-Ribose) Polymerase Cleavage and Activation of Caspase-9. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *473*, 117–125.

Stewart, B.; Wild, C. World Cancer Report 2014. *World Heal. Organ* **2014**.

Subbaramaiah, K.; Michaluart, P.; Sporn, M. B.; Dannenberg, a J. Ursolic Acid Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription in Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2399–2404.

Subbegowda, R.; Frommel, T. O. Aspirin Toxicity for Human Colonic Tumor Cells Results from Necrosis and Is Accompanied by Cell Cycle Arrest Aspirin Toxicity for Human Colonie Tumor Cells Results from Necrosis and Is Accompanied by Cell Cycle Arrest1. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 2772–2776.

Surh, Y. J. Anti-Tumor Promoting Potential of Selected Spice Ingredients with Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities: A Short Review. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1091–1097.

Tanaka, A.; Konno, M.; Muto, S.; Kambe, N.; Morii, E.; Nakahata, T.; Itai, A.; Matsuda, H. A Novel NF-kappaB Inhibitor, IMD-0354, Suppresses Neoplastic Proliferation of Human Mast Cells with Constitutively Activated c-Kit Receptors. *Blood* **2005**, *105*, 2324–2331.

Taraphdar, A. K.; Roy, M.; Bhattacharya, R. K. Natural Products as Inducers of Apoptosis : Implication for Cancer Therapy and Prevention. *Curr. Sci.* **2001**, *80*, 1387–1396.

Thompson, A. E.; Ray, D. T. Breeding Guayule. *Plant Breed. Rev. Vol. 6* **1989**, 93–165.

Tian, Z.; Yang, M.; Huang, F.; Li, K.; Si, J.; Shi, L.; Chen, S.; Xiao, P. Cytotoxicity of Three Cycloartane Triterpenoids from *Cimicifuga Dahurica*. *Cancer Lett.* **2005a**, *226*, 65–75.

Tian, Z.; Yang, M.; Huang, F.; Li, K.; Si, J.; Shi, L.; Chen, S.; Xiao, P. Cytotoxicity of Three Cycloartane Triterpenoids from *Cimicifuga Dahurica*. *Cancer Lett.* **2005b**, *226*, 65–75.

Totzke, G.; Schulze-Osthoff, K.; Jänicke, R. U. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors Sensitize Tumor Cells Specifically to Death Receptor-Induced Apoptosis Independently of COX-2 Inhibition. *Oncogene* **2003**, *22*, 8021–8030.

Tsao, A.; Kim, E.; Hong, W. K. Chemoprevention of Cancer. *Cancer Res* **2004**, *54*, 150–180.

Ulrich, C. M.; Bigler, J.; Potter, J. D. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Cancer Prevention: Promise, Perils and Pharmacogenetics. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 130–140.

Vermeulen, K.; Stranad, M.; Krystof, V.; Havlíček, L.; Van der Aa, A.; Lenjou, M.; Nijs, G.; Rodrigus, I.; Stockman, B.; Van Onckelen, H.; et al. Antiproliferative Effect of Plant Cytokinin Analogues with an Inhibitory Activity on Cyclin-Dependent Kinases. *Leukemia* **2002**, *16*, 299–305.

Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–149.

Wang, C.; Wu, X.; Chen, M.; Duan, W.; Sun, L.; Yan, M.; Zhang, L. Emodin Induces Apoptosis through Caspase 3-Dependent Pathway in HK-2 Cells. *Toxicology* **2007**, *231*, 120–128.

Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the Era of Molecular Oncology. *Nature* **2008**, *452*, 580–589.

Whitworth, J. W.; Whitehead, E. E. Guayule: Natural Rubber. A Technical Publication with Emphasis on Recent Findings. *Guayule Nat. rubber. A Tech. Publ. with Emphas. Recent Find.* **1991**.

William, W. N.; Heymach, J. V.; Kim, E. S.; Lippman, S. M. Molecular Targets for Cancer Chemoprevention. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 213–225.

Wong, Y. H.; Abdul Kadir, H.; Ling, S. K. Bioassay-Guided Isolation of Cytotoxic Cycloartane Triterpenoid Glycosides from the Traditionally Used Medicinal Plant *Leea Indica*. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 164689.

Wu, G.-S.; Lu, J.-J.; Guo, J.-J.; Li, Y.-B.; Tan, W.; Dang, Y.-Y.; Zhong, Z.-F.; Xu, Z.-T.; Chen, X.-P.; Wang, Y.-T. Ganoderic Acid DM, a Natural Triterpenoid, Induces DNA Damage, G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 408–414.

Yang, L.; Wu, S.; Zhang, Q.; Liu, F.; Wu, P. 23,24-Dihydrocucurbitacin B Induces G2/M Cell-Cycle Arrest and Mitochondria-Dependent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells (Bcap37). *Cancer Lett.* **2007**, *256*, 267–278.

De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. J.; Young, J. M. Edema and Cell Infiltration in the Phorbol Ester-Treated Mouse Ear Are Temporally Separate and Can Be Differentially Modulated by Pharmacologic Agents. *Agents Actions* **1989**, *26*, 335–341.

Yu, C. X.; Zhang, X. Q.; Kang, L. D.; Zhang, P. J.; Chen, W. W.; Liu, W. W.; Liu, Q. W.; Zhang, J. Y. Emodin Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell LNCaP. *Asian J. Androl.* **2008**, *10*, 625–634.

Zhang, B.; Wang, Z. F.; Tang, M. Z.; Shi, Y. L. Growth Inhibition and Apoptosis-Induced Effect on Human Cancer Cells of Toosendanin, a Triterpenoid Derivative from Chinese Traditional Medicine. *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 547–553.

Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Cell Death Mechanisms: Cross-Talk and Role in Disease. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1374–1383.

Zhou, B.-B. S.; Zhang, H.; Damelin, M.; Geles, K. G.; Grindley, J. C.; Dirks, P. B. Tumour-Initiating Cells: Challenges and Opportunities for Anticancer Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 806–823.

## 9. ANEXOS

Romero, J. C., Martínez-Vázquez, A., Herrera, M. P., Martínez-Mayorga, K., Parra-Delgado, H., Pérez-Flores, F. J., & Martínez-Vázquez, M. (2014). Synthesis, anti-inflammatory activity and modeling studies of cycloartane-type terpenes derivatives isolated from *Parthenium argentatum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22 (24), 6893–6898. doi:10.1016/j.bmc.2014.10.028



Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmc](http://www.elsevier.com/locate/bmc)

## Synthesis, anti-inflammatory activity and modeling studies of cycloartane-type terpenes derivatives isolated from *Parthenium argentatum*



Juan Carlos Romero<sup>a,†</sup>, Adriana Martínez-Vázquez<sup>a</sup>, Maribel Pineda Herrera<sup>a</sup>, Karina Martínez-Mayorga<sup>a</sup>, Hortensia Parra-Delgado<sup>b,\*</sup>, Francisco J. Pérez-Flores<sup>a</sup>, Mariano Martínez-Vázquez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, C. P. 04510 México, D.F., Mexico

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Campus Coquimatlán, Km 9, Carr. Colima-Coquimatlán, Colima, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 May 2014

Revised 7 October 2014

Accepted 17 October 2014

Available online 25 October 2014

## Keywords:

Argentatins

Triterpenes

Cycloartanes

Anti-inflammatory activity

TPA-induced mice model

Docking

## ABSTRACT

The 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced edema model in mice determined the anti-inflammatory activities in vivo of argentatins A, B and D, the main cycloartenol-type triterpenes present in *Parthenium argentatum*. Our results showed that argentatin B ( $ED_{50} = 1.5 \times 10^{-4}$  mmol/ear) and argentatin A ( $ED_{50} = 2.8 \times 10^{-4}$  mmol/ear) were more potent anti-inflammatory agents than indomethacin ( $ED_{50} = 4.5 \times 10^{-4}$  mmol/ear), the reference drug. Based on these findings, we decided to evaluate 13 derivatives of argentatins A and B. All the derivatives showed anti-inflammatory activity in the TPA-induced edema model in mice. The most active compound was 25-nor-cycloart-3, 16-dione-17-er-24-oic acid, obtained from argentatin A ( $ED_{50} = 1.4 \times 10^{-4}$  mmol/ear). Argentatin B was assayed as inhibitor of COX-2 activity one of the key enzymes involved in the TPA assay. The results showed that argentatin B at 15  $\mu$ M doses inhibited 77% COX-2 activity. Docking studies suggest that argentatin B interacts with Arg 120, a key residue for COX-2 activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

During the last two decades, a wealth of information has pointed to the deregulated inflammatory response as the cause of most chronic diseases, including different types of cancer.<sup>1,2</sup> The identification of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, AP-1 and STAT3 and their gene products such as tumor necrosis factor, interleukins-1, -6, chemokines, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase, matrix metalloproteases, and vascular endothelial growth factor, adhesion molecules and others have provided the molecular basis for the role of inflammation in cancer.<sup>1</sup> These pathways have been implicated in transformation, survival, proliferation, invasion, angiogenesis, metastasis, chemo-resistance, and radio-resistance of cancer, so much so that survival and proliferation of most types of cancer stem cells themselves appear to be dependent on the activation of these inflammatory pathways.<sup>3,4</sup>

Natural products have been investigated as anti-inflammatory agents, for example several cycloartane glycosides, isolated from

*Astragalus membranaceus* have recently explored for anti-inflammatory properties showing significant inhibition of NO production.<sup>5</sup> Other example are terpenoids isolated from *Krameria pauciflora*, these compounds unselectively inhibited cyclooxygenases 1 and 2.<sup>6</sup>

In order to achieve greater therapeutic relevance it seems valuable that an anticancer compound could also have anti-inflammatory activity.<sup>1,7</sup> Taking into consideration this idea and based on our previous reports on the anti-proliferative effect against several human cancer cell lines of the argentatins A (1), E (2) and D (3) (Fig. 1) and some of their derivatives,<sup>8,9</sup> in this work we tested the anti-inflammatory activities of 1–3 as well as 13 derivatives (Table 1 and Scheme 1) in the TPA-induced edema in mice model. Docking studies for argentatin B is presented along with COX-2 inhibitory activity for selected compounds in this work.

## 2. Results and discussion

## 2.1. Chemistry

Argentatin A (1), B (2) and D (3) were obtained from the resin of *Parthenium argentatum* (Gray) as previously reported and

\* Corresponding authors. Tel: +52 55 56224403; fax: +52 55 56162203.

E-mail addresses: [hparra@uocol.mx](mailto:hparra@uocol.mx) (H. Parra-Delgado), [marvaz@servidor.unam.mx](mailto:marvaz@servidor.unam.mx) (M. Martínez-Vázquez).

† Current address: Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n, C. P. 1101608 Loja, Ecuador.



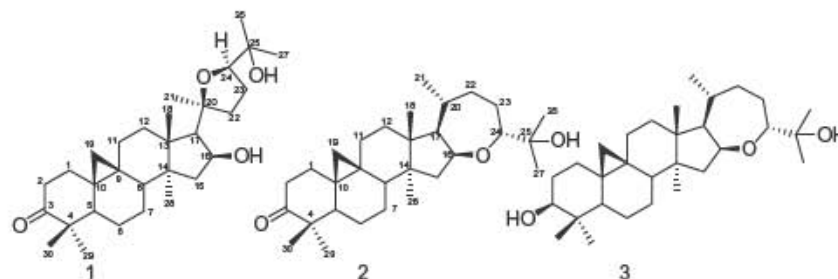


Figure 1. Structures of argentatins A (1), B (2) and D (3).

Table 1  
The anti-inflammatory activities of triterpenes 1–16

Compound	ED <sub>50</sub> (CI) (mg/ear)	ED <sub>50</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol/ear)
1	0.13 (0.1, 0.17) <i>r</i> = 0.971	2.8
2	0.07(0.06, 0.08) <i>r</i> = 0.963	1.5
3	0.35(0.30, 0.42) <i>r</i> = 0.982	7.6
4	0.36 (0.26, 0.49) <i>r</i> = 0.985	6.5
5	0.17 (0.15, 0.21) <i>r</i> = 0.999	3.1
6	0.26 (0.18, 0.38) <i>r</i> = 0.995	5.3
7	ND	ND
8	0.57 (0.42,0.82) <i>r</i> = 0.997	12.1
9	0.28 (0.16,0.41) <i>r</i> = 0.937	6.5
10	0.11 (0.10,0.13) <i>r</i> = 0.978	2.3
11	0.06 (0.05,0.08) <i>r</i> = 0.990	1.4
12	ND	ND
13	0.08 (0.06,0.11) <i>r</i> = 0.942	1.5
14	0.45 (0.31,0.65) <i>r</i> = 0.999	9.6
15	0.12 (0.10,0.15) <i>r</i> = 0.949	2.5
16	0.22 (0.17,0.28) <i>r</i> = 0.979	4.7
Indomethacin	0.16 (0.15, 0.18) <i>r</i> = 0.951	4.5

Dose causing 50% of anti-inflammatory effect (ED<sub>50</sub>) was calculated from a regression equation (*r*) using significant data (*P* < 0.05) after a dose–response curve (*n* = 4–8). CI = confidence interval. ND = it was not determined.

identified by comparison of its physical and spectroscopic constants (mp, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) with those reported in literature.<sup>8–10</sup>

The 4–6, 8–10 and 12–15 derivatives were synthesized as previously reported.<sup>8–10</sup> The lactam 7 was synthesized from the oxime 6 by a Beckman rearrangement. The derivative 11 was obtained from 9 by reflux of KOH in ethanol and the lactone 16 was synthesized from 2 by a Baeyer–Villiger rearrangement. All derivatives were purified by conventional procedures and characterized by spectroscopic and analytical methods (see Section 4).

## 2.2. Biological activity

### 2.2.1. Anti-inflammatory and COX-2 inhibition assays

The 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced edema model was used to evaluate the anti-inflammatory activity of 1–3.<sup>11–15</sup> Our results showed that these triterpenes presented a dose-related anti-inflammatory activity. Furthermore, 2 was approximately two-fold more potent than indomethacin (Table 1). Based on these encouraging results, we synthesized the derivatives 4–11 from argentatin A (1) as well as the derivatives 12–16 from argentatin B (2) (Scheme 1).

The anti-inflammatory activity of each derivative was evaluated *in vivo* using the same experimental conditions employed for the evaluation of 1–3. According to our results, all synthesized derivatives showed anti-inflammatory activity. The doses of all compounds are in ×10<sup>-4</sup> mmol/ear. The derivatives 4–9 were less potent as anti-inflammatory agents than the parent compound, argentatin A (1), IC<sub>50</sub> value for 7 was not determined (Table 1). However, the derivative 5 was more potent than indomethacin,

the reference drug. It is interesting to note that by changing a hydroxyl group as in 1 by a ketone group at C-16 as in 8, the activity of the later decreased more than four times compared to the activity of 1. On the other hand, the activity of 10 compared with that of 1 is about the same. Thus, the presence of the β-hydroxyl group at C-3 as in 10 is not relevant for the anti-inflammatory activity. The opening of the five member ring of 1 produce the carboxylic acid 11, which is the most active compound of the series, indicating the possibility that open chain derivatives could be more active (Table 1).

With respect to argentatin B (2) derivatives (Scheme 1), none of the structural modifications rendered more active compounds, remaining the parent compound 2 the most active of this series, (Tables 1). IC<sub>50</sub> value for compound 12 was not determined.

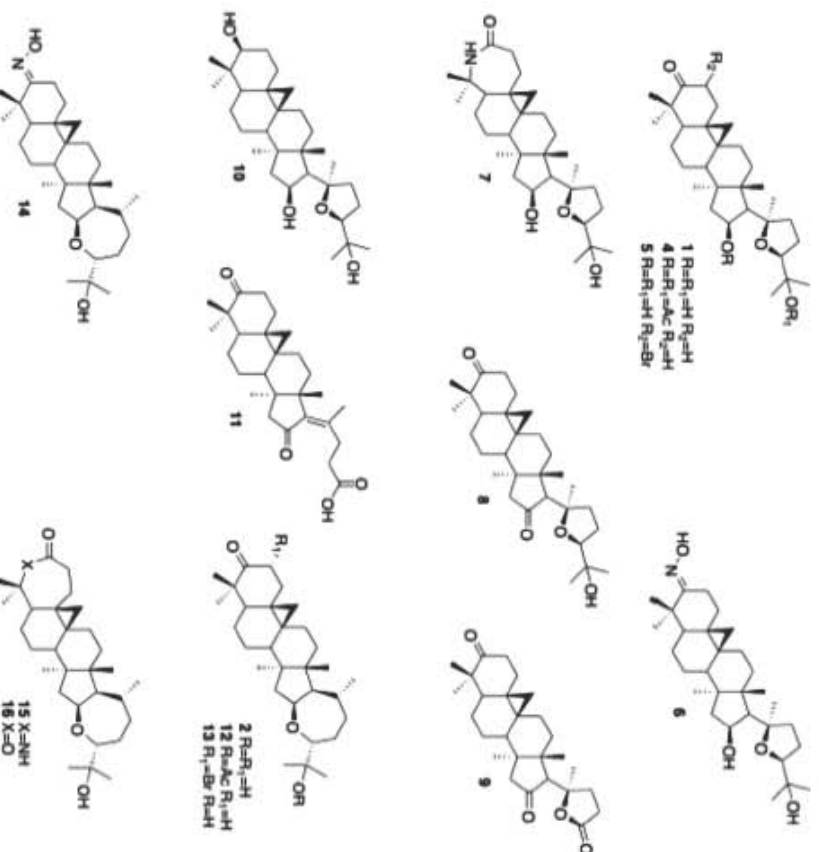
It is well known that COX-2 is one of the principal enzymes involved in the TPA-induced edema.<sup>16</sup> In order to gain knowledge about the mechanism of action of the compounds reported in this work, we evaluated the inhibitory profile of compounds 2, 11 and 13 on COX-2 activity. Notably, our results showed that at 15 μM compound 2 inhibited 78.77% of the enzyme's activity. Surprisingly, compound 11, the most active in the TPA *in vivo* assay, did not show inhibition of COX-2. Similarly, compound 13 is among the most active compounds in the TPA assay but inhibits only on 12% at 100 μM. These results support the known complexity of inflammatory processes, where modulation of COX-2 activity plays a key role but other biological mechanisms cannot be ruled out.<sup>17</sup> Previous studies indicated that the derivative 13 showed a good anti-proliferative activity against some human cancer lines,<sup>9</sup> thus 13 has remarkable anti-inflammatory and anti-proliferative activities.

### 2.2.2. NO production in peritoneal macrophages

When stimulated *in vitro* by lipopolysaccharide (LPS), macrophages produce a number of cytokines and other inflammatory mediators, including TNFα and nitric oxide (NO), both of which contribute directly to the ability of macrophages to kill invading bacteria and tumor cells and to the pathogenesis of septic shock.

Thus, we evaluated the effects of 1 and 2 on the production of NO from mouse peritoneal macrophages. Macrophages (Mφ) showed an enhanced nitrite release when they were stimulated with LPS (Table 2). Our results showed that 1, at 31 and 100 μM significantly reduce the nitrite release by LPS-treated macrophages. However 2 was active only at 100 μM. A similar behavior was observed when 1 and 2 were evaluated on the production of NO from resting macrophages.

However, the results of macrophage viability determined in the MTT assay showed that both 1 and 2 decreased viability on 63% and 53%, respectively at 50 μM doses. These results suggest that the decrease on NO production shown by compounds 1 and 2 are due to the influence on cell viability induced by these triterpenes.



Scheme 1. Chemical structures of compounds 1–16.

**Table 2**  
Production of nitric oxide from mouse peritoneal macrophages induced by 1 and 2

Group	3.1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	31 $\mu$ M	100 $\mu$ M
1 Me with LPS	50.6 $\pm$ 5.3	48.7 $\pm$ 4.7	41.7 $\pm$ 4.9	17.8 $\pm$ 2.3 <sup>*</sup>
2 Me with LPS	53.7 $\pm$ 6.2	47.6 $\pm$ 6.6	40.1 $\pm$ 4.9	23.6 $\pm$ 2.7 <sup>*</sup>
1 Me without LPS	30.94 $\pm$ 2.9	33.9 $\pm$ 1.8	25.5 $\pm$ 2.4	15.9 $\pm$ 2.3 <sup>*</sup>
2 Me without LPS	29.6 $\pm$ 2.3	39.6 $\pm$ 1.0	31.6 $\pm$ 0.9	20.0 $\pm$ 1.5 <sup>*</sup>

Me = macrophages, LPS = lipopolysaccharide. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE,  $n = 3$ –5, <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  significantly different compared with the control (Dunnett's test).

### 2.2.3. Molecular docking

Since argentinatin B showed inhibitory activity towards COX-2 and X-ray structures of COX-2 enzyme are available, we performed docking studies of argentinatin B with COX-2. Modulation of a single biological mechanism was the rational model of drug discovery during the last decade. However, this idea has moved from the single target to the multitarget approach.<sup>18</sup> This new paradigm has its roots on the polypharmacology concept. The interaction of small molecules with multiple targets gives a rationale not only for undesired side effects, but also for the possibility of finding additional biological activities for already bioactive compounds. In the case of drugs this includes the area of drug repurposing. More recently, this has been extended to the search of biological activity of other compound datasets, such as flavor chemicals.<sup>19</sup>

A complete list of binding interactions between the co-crystallized inhibitor, SC-558, and COX-2 is described elsewhere.<sup>9</sup> The most significant ones are: (A) the trifluoromethyl group orients towards residues Arg 120 and Tyr 355, blockade of this region is

the hallmark of COX inhibition, (B) the phenylsulphonamide moiety, which might be responsible for selectivity between isoforms, interacts via hydrogen bond with His 90, Gln 192 and Arg 513, and (C) Val 523 and Val 434 seem to promote COX-2 selectivity by facilitating the entrance to an adjacent binding site, which is buried in the absence of a ligand and inexistent in COX-1.<sup>9</sup> These structural features were used to rationalize putative binding modes of argentinatin B into the COX-2 active site.

Figure 2 shows the predicted binding mode for argentinatin B (2) (ED<sub>50</sub> = 15.3 mol/ear) into the COX-2 binding site. The thick dark gray lines describe argentinatin B, SC-558 is shown as thin dark gray lines, and three relevant residues are colored white. In this pose, the –OH group of argentinatin B orients nearby Arg 120 with a distance of 2.58 Å. Interaction with Arg 120 seems crucial for inhibition of COX. The carbonyl group, at the other end of the molecule, orients towards residues associated with selectivity, the phenylsulphonamide group in SC-558 occupies this region, and the carbonyl group of argentinatin B has a hydrogen bond



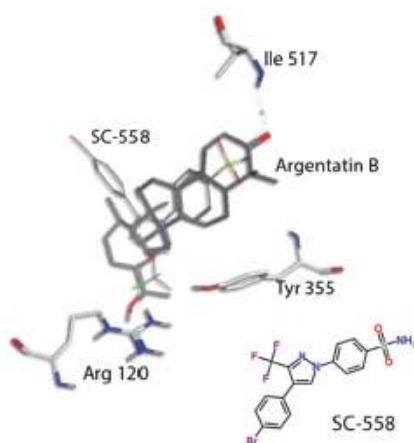


Figure 2. Binding mode of argentatin B into COX-2 active site as obtained from induced fit docking. SC-558 is shown for reference.

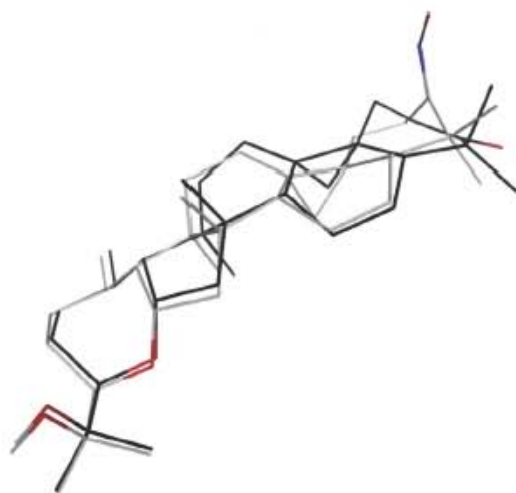


Figure 3. Comparison of argentatin B (black) and compound 14. Conformations and relative orientations as obtained from induced fit docking.

interaction with Ile 517. For comparison, analogue **14** ( $ED_{50} = 9.5$  mmol/ear) was also docked. The overall orientation coincided with that of argentatin B. Molecule **14** contains an oxime functional group; which is deprotonated at pH = 7, the N–O group occupies the same region as that of the carbonyl group in argentatin B and makes a hydrogen bond interaction with Arg 513. A closer look at the structure reveals a conformational distortion with respect to argentatin B. Figure 3 shows the comparison of argentatin B and compound **14** as obtained from docking. Lastly, compound **1** was also docked into COX-2 active site. In this model (Figure 4S, Supplementary data), argentatin A makes a hydrogen bond interaction with Gly 527 and the oxygen atom of the furan group remains at 2.67 Å to the closest hydrogen atom of Arg 120, moreover, this oxygen atom makes an intramolecular hydrogen bond with the neighboring –OH group, making it less accessible to interact with Arg 120.

It is important to note that although COX-2 is relevant in the TPA-induced edema model there are other enzymes in the anti-inflammatory process affecting this assay, and then it cannot be discarded that the triterpenes evaluated in the TPA-induced edema model may also affect other enzymatic pathways.

### 3. Conclusion

In summary, our results show that the argentatins A (**1**), B (**2**) and D (**3**) possess anti-inflammatory activity in the TPA-induced ear edema in mice. Taking these results into consideration we evaluated the anti-inflammatory activity of 13 argentatins A and B derivatives. Our findings show that **2** and 25-nor-cycloart-3, 16-dione-17-en-24-oic acid (**11**) were the most active compounds. Evaluation of **2** in a COX-2 enzymatic assay shows 78.77% inhibition at 15  $\mu$ M. Binding modes predicted from docking studies suggest that **2** interacts with a key amino acid residue involved in COX-2 activity, namely Arg 120. This model agrees reasonably well with the observed anti-inflammatory properties of **2**. However, **11** the compound most actives in the TPA in vivo assay did not showed inhibition of COX-2. These results demonstrate that although the inducible COX-2 is important in the TPA induced inflammation are other factors that contribute to this condition.

### 4. Experiments

#### 4.1. Materials and measurements

Melting points were determined on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. The IR spectra were recorded in a Nicolet FT-55X spectrophotometer. Optical rotation values were determined on a Perkin Elmer 343 polarimeter.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at 200 MHz or 300 MHz (as indicated) on a Varian-Gemini 200, Unity 300, Eclipse 300 Jeol or Bruker-Avance 300 spectrometers. Chemical shifts are expressed in  $\delta$  (ppm) relative to TMS as internal standard and coupling constants  $J$  in Hz. Solvent is indicated for each compound. Mass spectra were recorded on a Jeol AH505HR mass spectrometer.

#### 4.1.1. Isolation of argentatins

The isolation of argentatins A, B and D was conducted as previously reported. The resin is a by-product of the industrial process to obtain natural rubber from *P. argentatum*. The derivatives **4–6**, **8**, **9** and **10** were obtained from argentatin A as previously reported.<sup>10</sup>

#### 4.1.2. Synthesis of **7**, **11** and **16** derivatives

**4.1.2.1. 4-Aza-20, 24-epoxy-16, 25-dihydroxy-cycloartan-3-one (7).** Compound **6** (100 mg) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  cooled at 0 °C was treated with trifluoroacetic anhydride (0.5 mL) and the reaction was stirred for 18 min. Reaction mixture was evaporated and 16-trifluoroacetoxy derivative was first obtained. It was treated with a suspension of potassium carbonate in methanol for 15 min at room temperature to give the product **7**, which was purified by chromatographic procedures. Yield: 38 mg, 38%. White solid (EtOAc) mp 181–182 °C;  $[\alpha]_D^{25} -32.39^\circ$  (c 4.6 mg/mL,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.61 (1H, d,  $J = 6$  Hz, H-19<sup>\*</sup>), 0.68 (1H, d,  $J = 6$  Hz, H-19), 0.86 (3H, s, H-29/30)<sup>\*</sup>, 1.11 (3H, s, H-18), 1.21 (3H, s, H-21), 1.26 (3H, s, H-27), 1.30 (3H, s, H-26), 1.33 (3H, s, H-29/30)<sup>\*</sup>, 3.1 (1H, m, H-2), 3.83 (1H, t,  $J = 7$  Hz, H-24), 4.60 (1H, m, H-16), 7.5 (1H, s, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.2 (C-18), 20.3 (C-28), 21.0 (C-6), 21.0 (C-9), 22.1 (C-29), 23.9 (C-23), 24.4 (C-30), 25.3 (C-21), 26.5 (C-7), 26.5 (C-10), 26.7 (C-11), 27.0 (C-26), 27.5 (C-27), 29.5 (C-1), 29.9 (C-2), 30.8 (C-19), 33.0 (C-12), 36.2 (C-22), 45.5 (C-14), 45.9 (C-13), 48.2 (C-5), 48.5 (C-8), 50.08 (C-15), 55.5 (C-4), 56.3 (C-17), 69.4 (C-25), 71.5 (C-16), 83.4 (C-24), 85.6 (C-20), 175.6 (C-3). IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3612, 3395, 2963, 2871, 1644  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS  $m/z$  (%): 487 ( $\text{M}^+$ , 29.27), 429 ( $\text{M}^+ - 58$ , 5.4), 428 (11.5), 413 (64.86), 58 (100). HRMS: Found  $m/z$  488.3726,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{NO}_4$  required 488.3739.



**4.1.2.2. 3,16-Dioxo-25-nor-cycloart-17-en-24-oic acid (11).** A solution of 100 mg of **9** in EtOH was refluxed with 289 mg of potassium hydroxide for 40 min. After the reaction was neutralized at room temperature usual work up allowed obtaining the product **11**. Yield: 70 mg, 70%. Mp 182–184 °C.  $[\alpha]_D^{25}$   $-96^\circ$  (c 7 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.64 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, H-19), 0.86 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, H-19'), 0.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  20.2 (C-18), 20.7 (C-28), 20.8 (C-30), 20.9 (C-9), 21.2 (C-29), 22.1 (C-21), 22.6 (C-6), 26.0 (C-7), 26.3 (C-11), 26.3 (C-10), 29.2 (C-23), 30.6 (C-19), 30.8 (C-22), 32.6 (C-12), 33.1 (C-1), 37.2 (C-2), 42.3 (C-13), 45.7 (C-14), 47.9 (C-8), 48.2 (C-5), 50.20 (C-4), 51.0 (C-15), 141.7 (C-17), 149.5 (C-20), 177.8 (C-24), 207.3 (C-16), 216.0 (C-3). IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3327, 1741, 1703, 1615 cm<sup>-1</sup>. EIMS  $m/z$  (%): 426 (M<sup>+</sup>, 39.69), 411 (100), 143 (4.5), 125 (3). HRMS: Found  $m/z$  427.2864, [M+H]<sup>+</sup>; C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> required 427.2848.

The derivatives **12–15** were obtained from argentatin B (**2**) as previously reported.<sup>3</sup>

**4.1.2.3. (16 $\beta$ ,24R)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3,4-lactone (16).** Triterpene **2** (300 mg) was treated with *meta*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPBA) (174 mg). Typical Baeyer–Villiger rearrangement led to obtain lactone **16**. Yield: 124 mg, 40%. Mp 136–138 °C.  $[\alpha]_D^{25}$   $-36.5^\circ$  (c 6.8 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.50 (d,  $J = 4.4$ , 1H, H-19), 0.66 (d,  $J = 4.9$ , 1H, H-19'), 0.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.05 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-30), 2.70 (m, 2H), 2.17 (s, OH), 3.60 (bd,  $J = 11.4$ , 1H, H-24), 4.60 (q, 1H, H-16). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  18.9 (C-18), 19.6 (C-28), 20.8 (C-21), 27.3 (C-10), 22.7 (C-9), 22.9 (C-29), 23.3 (C-23), 23.8 (C-26), 24.9 (C-1), 25.3 (C-6), 25.7 (C-2), 25.8 (C-27), 26.7 (C-11), 26.7 (C-7), 28.8 (C-20), 29.6 (C-19), 30.9 (C-30), 32.6 (C-12), 35.3 (C-22), 44.9 (C-15), 45.0 (C-14), 45.2 (C-13), 48.2 (C-8), 49.7 (C-5), 57.0 (C-17), 73.1 (C-25), 74.9 (C-16), 87.1 (C-4), 82.4 (C-24), 175.4 (C-3). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu_{\max}$  3502, 2970, 1702 cm<sup>-1</sup>. EIMS  $m/z$  (%): 472 (M<sup>+</sup>, 9.8), 414 (M<sup>+</sup>–58, 15), 413 (100), 143 (16.2), 55 (33). HRMS: Found  $m/z$  473.3615 [M+H]<sup>+</sup>; C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub> required 473.3630.

## 4.2. Biological experiments

### 4.2.1. Evaluation of anti-inflammatory activity of triterpenes using 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced edema model

**Animals.** Male CD-1 mice, weighing 20–25 g each, were provided by *Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México*. All experimental animals were held under standard laboratory conditions with 12/12 light-dark cycle. They were fed laboratory diet and water ad libitum. All experiments were carried out using 4–8 animals per group.

Effects of each compound on TPA-induced ear edema in mice were determined as reported by De Young et al.<sup>20</sup> with minor modifications. The substances, dissolved in ethyl acetate (EtOAc), were topically administered ranging 0.05–1 mg/ear. Indomethacin was used as positive control.

A solution of TPA (2.5  $\mu$ g) in EtOH (10  $\mu$ l) was applied topically to both faces (5  $\mu$ l each face) of the right ear of the mice. After 10 min, the test substances were applied (10  $\mu$ l each face). The left ear received ethanol (10  $\mu$ l) followed by 20  $\mu$ l of EtOAc.

After four hours, the mice were sacrificed by cervical dislocation. A 9-mm-diameter plug was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between right and left ear plugs.<sup>20</sup> Percentage of inhibition of edema (%EI) was calculated using the equation:

$$\%EI = 100 - [B \times 100/A]$$

with  $A$  = edema induced by TPA, and  $B$  = edema induced by TPA plus test compound.

Weight data are expressed as the mean  $\pm$  its SE of 4–8 mice. Statistical differences between control and treated groups were determined using an ANOVA followed by a Dunnett's test,  $P < 0.05$  values were considered significant. Percentage of edema inhibition for each dose was calculated as previously described. The effective dose 50 (ED<sub>50</sub>) values were calculated from regression equation using significant data.

### 4.2.2. In vitro cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition assay

The ability of argentatin B to inhibit COX-2 was determined using a colorimetric COX inhibitor-screening assay (Cayman Chemical, Item 56031). The determination was achieved following the manufacture instructions.

### 4.2.3. Determination of NO concentration

**4.2.3.1. Isolation and culture of primary peritoneal macrophages.**<sup>9</sup> Swiss female mice weighing 25–30 g were conditioned in agreement with the Animal Care and Use Committee (PROY-NOM 087-ECOL-SSA1-2000). Mice were injected intraperitoneally with 1 mL of 3% (wt vol<sup>-1</sup>) thioglycollate 3 days prior to harvesting. Peritoneal exudate cells (PEC) were harvested, washed, and suspended in DMEM. PEC were seeded into 24-well plates (Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, and then incubated for 2 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Nonadherent cells were washed off and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. Cells were treated for 24 h at 37 °C, with 60 U mL<sup>-1</sup> SOD, with or without 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> LPS both in the absence and presence of test compounds (1–4) and UA. Concentrations between 0.001–10  $\mu$ M for 1–4 and 0.001–1  $\mu$ M for UA were used. All the substances tested were solved in EtOH. The final concentration of EtOH in the cell culture supernatant was  $\leq 0.1\%$ . This concentration did not show any effect on the assays.

### 4.2.3.2. Nitrite production in peritoneal macrophages.

Nitrite accumulation was determined by mixing equal volumes (100  $\mu$ l each) of cell culture medium and Griess reagent [1% sulphanimide/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>], at 20 °C for 10 min, and the OD were read on a Microplate Reader at 515 nm. Nitrite concentration ( $\mu$ M) was determined by interpolation of standard curves constructed with known concentrations of NaNO<sub>2</sub>.

### 4.2.4. Cell viability

Cell respiration, an indicator of cell viability, was determined in the remaining macrophages by modified MTT method.<sup>11</sup> Briefly, 10  $\mu$ l of MTT (5 mg mL<sup>-1</sup> in PBS) was added to remaining cells into 96-well plates which were, then, incubated for 4 h at 37 °C. Incorporated dye was solved in DMSO (100  $\mu$ l). Absorbance was measured on a microplate reader at 515 nm. Results were expressed as percentage of MTT incorporated in treated cells in respect to control cells.

### 4.2.5. Docking methods

Modeling studies consisted of automated docking implemented in MOE 2012.101<sup>12</sup> using the MMFF94s force field. The COX-2 crystal structure selected for this study (PDB-ID: 1CX2) is co-crystallized with SC-558, which is a selective COX-2 inhibitor; \_ENREF\_9 this ligand occupies the COX-2 active site. To account, at least partially, for protein flexibility, rigid docking was followed by induced fit docking, using default settings.

### Acknowledgements

J.C.R. acknowledges to Programa de Doctorado en C. Biomédicas UNAM and to SENESCYT Ecuador for financial support. Partial financial support from CONACYT (Mexico) (152650) is acknowledged. We are very grateful to T. Ramirez-Apan; H. Ríos; R. Patiño; Á. Peña; E. Huerta and L. Velasco for technical assistance. K.M.-M. thanks DGAPA-UNAM (PAPIIT IA200513-2).

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.10.028>.

### References and notes

- Balkwill, F.; Mantovani, A. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 33.
- Moore, M.; Chua, W.; Charles, K.; Clarke, S. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 504.
- Aggarwal, B. B.; Gehlot, P. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 351.
- Coussens, L.; Zitvogel, L.; Palucka, K. *Science* **2013**, *339*, 286.
- Lee, D.-Y.; Noh, H.-J.; Choi, J.; Lee, K.-H.; Lee, M.-H.; L.J.-H.; Hong, Y.; Lee, S.-E.; Kim, S. Y.; Kim, G.-S. *Molecules* **2013**, *18*, 3725.
- Ramirez-Cisneros, M. A.; Rios, M. A.; Rios-Gomez, R.; Aguilar-Guadarrama, B. *Hanta Med.* **2012**, *78*, 1942.
- Grivennikov, S.; Greten, F.; Karin, M. *Cell* **2010**, *140*, 883.
- Parra-Delgado, H.; Ramirez-Apan, T.; Martinez-Vazquez, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1005.
- Parra-Delgado, H.; Compadre, C. M.; Ramirez-Apan, T.; Muñoz-Fambuenza, M. J.; Compadre, R. L.; Ostrosky-Wegman, P.; Martínez-Vázquez, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1889.
- Rodriguez-Han, L.; Romo de Vivar, A.; Ortega, A.; Aguilar, M.; Romo, J. *Rev. Latinoam. Quim.* **1970**, *1*, 24.
- Oviedo-Chávez, I.; Ramirez-Apan, T.; Soto-Hernández, M.; Martínez-Vázquez, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 1087.
- Aguirre, M. C.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Erazo, S.; Letelier, M. E.; Cassels, B. K.; Silva, X.; Alegria, S.; Negrete, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5673.
- Aguila, S.; Rojano, B.; Recio, M. C.; Giner, R. M.; Schinella, G. R.; Debenedetti, S. L.; Saez, J.; Rios, J. L. *Planta Med.* **2009**, *75*, 18.
- Chibli, L.; Rodrigues, K. C. M.; Gasparetto, C. M.; Pinto, N. C. C.; Fabri, R. L.; Scio, E.; Alves, M. S.; Del-Vechio-Vieira, G.; Sousa, O. V. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *154*, 330.
- Nadinic, E.; Gorzalczy, S.; Rojo, A.; van Baren, C.; Debenedetti, S.; Acevedo, C. *Fitoterapia* **1999**, 166.
- Salazar, R. J.; Martinez-Vazquez, M.; Cespedes, C. L.; Ramirez-Apan, T.; Nieto-Camacho, A.; Rodriguez-Silverio, J.; Flores-Murrieta, F. *Z. Naturforsch. [C]* **2010**, *66*, 24.
- Park, S.; Kim, Y. H.; Kim, Y.; Lee, S.-J. *J. Oncol.* **2012**, *41*, 933.
- Medina-Franco, J. L.; Giulianotti, M. A.; Welmaker, G. S.; Houghten, R. A. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 495.
- Medina-Franco, J. L.; Martínez-Mayorga, K.; Peppard, T. L.; Del Río, A. *PLoS One* **2012**, *7*, 1.
- De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. J.; Young, J. M. *Agents Actions* **1989**, *26*, 335.