



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

INSTITUTO DE QUIMICA

**"Estudio toxicogenómico *in vivo* e *in vitro* de los efectos
biológicos de metabolitos secundarios de *Calophyllum
brasiliense*"**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JUAN CARLOS GOMEZ VERJAN

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RICARDO REYES CHILPA (INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES (FACULTAD DE QUIMICA, UNAM)
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO (FACULTAD DE QUIMICA, UNAM)

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DEL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos Institucionales

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2-5 del Departamento de Productos del Instituto de Química de la UNAM, el Laboratorio de Fitofarmacología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM y el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Gil A. Magos Guerrero y el Dr. Marco A. Cerbón Cervantes.

La presente investigación fue financiada por los proyectos:

Proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT (**IN210016**): "Bioprospección de la flora mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral"

Proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT (**IG200513**): "Compuestos antivirales (VIH-1) de Árboles Tropicales (Clusiaceae) de México: Estudio Químico y Toxicogenómico"

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por haberme otorgado la beca número 220346 con **CVU 262193** para la realización de los estudios de Doctorado.

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biomédicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México (PCBD-UNAM) por proporcionarme una plantilla académica de excelencia así como los medios e infraestructura para concluir mis estudios satisfactoriamente.

Al Comité Académico del Programa del Posgrado en Ciencias Biomédicas por los apoyos DGAPA-PAEP para las estancias de investigación y congresos.

Agradezco a **Becas Mixtas CONACYT 2014-MZO-2015** Movilidad en el Extranjero por la beca otorgada.

Agradezco al Proyecto **UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN210016)**: "Bioprospección de la flora mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral" por la **beca otorgada de Agosto a Diciembre de 2016**.

Agradezco al Dr. Patrick Aloy del Laboratorio de Bioinformática Estructural y Biología de Redes del Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB-Barcelona), por su apoyo durante mi estancia internacional.

Agradezco al Dr. Nuno L. Barbosa Morais del Laboratorio de Biología Computacional del Instituto de Medicina Molecular (iMM-Lisboa), de la Faculdade de Medicina, da Universidade de Lisboa, de Lisboa, Portugal, por su apoyo durante mi estancia internacional.

Agradezco al apoyo del personal de RMN y Espectrometría de Masas, Q. Maria de los Angeles Peña González y Dr. Francisco Javier Perez Flores del Instituto de Química de la UNAM.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa,

Dr. Marco A. Cerbón Cervantes,

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Agradecimientos a Título Personal

A mis PADRES por apoyarme de todas las formas posibles y en todo momento y sin dudarlo, día a día durante todos estos años y durante todo este ciclo, motivándome y orientándome para seguir adelante superando todos los baches que surgen durante el camino y estimulándome para seguir adelante y lograr todas las metas que me proponga, GRACIAS POR TODO sin su ayuda y soporte nada de esto sería posible.

A Manzanita por su amor y por ser mi compañera en todos los viajes y experiencias que hemos compartido hasta ahora y los que faltan.

A mis amigos: Oscar, Fernando, Male, Sofia, Edgar Estrella, Viris, JJ, Nacho, Chio, Pancho, Arlene, Otto, Ricardo, Lis, por todas las reuniones, conciertos y experiencias que ayudan hacer la vida divertida e importante.

A todos mis amigos del ChilpaLab: Karlita, LuciYos, Chio, Laura, George, Griselda, Itzel, y todos los demás por hacer divertido y amable el ambiente en el Laboratorio.

A todos los compañeros del Laboratorio del Dr. Cerbón por su apoyo durante los experimentos y seminarios durante este ciclo.

Al Doc. Chilpa por su invaluable apoyo académico, sus valiosos consejos y la paciencia durante este ciclo.

Al Doc. Cerbón por su amistad, consejos y su apoyo en infraestructura apoyando y motivando siempre.

Al Doc. Camacho por su amistad y consejos durante este ciclo.

A la Auxiliar del Posgrado en Ciencias Biomédicas del Instituto de Química, Alma Cortés por apoyarme en todos los trámites, papeleo y por su amistad durante todo este ciclo.

Al Dr. Nuno Morais por haberme apoyado durante mi estancia académica en el Instituto de Medicina Molecular de Lisboa, Portugal.

Al Dr. Patrick Aloy por haberme apoyado durante mi estancia académica en el IRB-Barcelona en Cataluña, España.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	A
LISTA DE TABLAS	D
LISTA DE ABREVIATURAS	E
RESUMEN	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 PRODUCTOS NATURALES Y DESARROLLO DE FÁRMACOS	3
2.2. CALOPHYLLUM SP COMO FUENTE DE PRODUCTOS NATURALES	4
2.3 ANTECEDENTES BOTANICOS DEL GÉNERO CALOPHYLLUM	5
2.4. QUÍMICA DEL GÉNERO CALOPHYLLUM	6
2.4.1. COUMARINAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>CALOPHYLLUM SP</i>	11
2.5. <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i>	12
2.5.1. COUMARINAS TIPO MAMMEA AISLADAS DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i>	15
2.5.2. COUMARINAS TETRACICLICAS AISLADAS DE <i>CALOPHYLLUM BRASILIENSE</i>	15
2.6. TOXICIDAD EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS	16
2.7. MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDAD	19
2.7.1. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACOS	21
2.7.2. METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE LA TOXICOLOGÍA	23
2.7.3. ESTUDIOS DE DOSIS ÚNICAS O DE TOXICIDAD AGUDA	24
2.7.4. ESTUDIOS DE DOSIS REPETIDAS	24
2.7.5. ESTUDIOS DE TOXICIDAD ESPECIAL	25
2.8. TOXICOGENÓMICA Y SUS APLICACIONES EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS	26
3. OBJETIVOS E HIPOTESIS	30
3.1. OBJETIVO GENERAL	30
3.1.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
3.2. HIPOTESIS	31
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
4.1. COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO	32
4.1.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS	32
4.2. ANALISIS QUIMIOINFORMÁTICO DE COMPUESTOS	33
4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS	34

4.3.1.TOXICIDAD AGUDA (LORKE)	34
4.3.2.ESTUDIO TOXICOGENÓMICO	34
4.3.2.1.PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS DE LOS MICROARREGLOS	35
4.3.2.2.ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO	35
4.3.2.3.ANÁLISIS DE REDES (INTERACTOMA)	36
4.3.3.ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO (EOSINA-HEMATOXILINA; PAS Y TUNEL)	37
4.4.CITOTOXICIDAD EN CELULAS K562	37
4.4.1.ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULAS K562 EN TRATAMIENTO	38
4.4.1.1.AISLAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE RNA	38
4.4.1.2.ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE DNA DE CÉLULAS K562	38
4.4.2.ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD	39
4.4.3.ELECTROFORESIS DE CELULAS EN GEL DE AGAROSA (ENSAYO COMETA)	39
4.4.3.1.EFECTO DIRECTO DE LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA (A/BA+A/BB) EN EL PLÁSMIDO pDEST26 (PLASMID NICKING ASSAY)	40
4.4.4.ENSAYOS DE MUERTE CELULAR Y APOPTOSIS	40
4.4.4.1.FRAGMENTACIÓN DE DNA (ENSAYO DE TUNEL)	40
4.4.4.2.INMUNOFUORESCENCIA CASPASA-3 ACTIVA	41
4.4.5.ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE CÉLULAS K562	41
4.4.6.ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺ DE CÉLULAS K562	42
4.5.ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	42
5. RESULTADOS	43
5.1.AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COUMARINAS	43
5.1.1 MAMMEA A/BA + A/BB (QT-1)	43
5.1.2.SOULATRÓLIDO (QT-2)	45
5.2.LAS COUMARINAS DE <i>C. BRASILIENSE</i> PRESENTAN POTENCIAL COMO POSIBLES "DRUG LEADS"	46
5.3.LAS COUMARINAS AISLADAS DE <i>C. BRASILIENSE</i> PRESENTAN UN PERFIL TOXICOLOGICO Y TOXICOGENÓMICO SEGURO	48
5.3.1.ANÁLISIS DE REDES	51
5.4.ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	52
5.5. LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB INDUCEN MUERTE CELULAR TIPO APOPTOSIS EN LAS CELULAS K562	58
5.5.1.ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE MAMMEA A/BA+A/BB SOBRE LA LÍNEA CELULAR K562	58

5.5.2.ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE MAMMEA A/BA+A/BB SOBRE LA LÍNEA CELULAR K562	59
5.5.3.PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULAS K562 A LAS 3 H DE TRATAMIENTO CON LA MEZCLA DE COUMARINAS	60
5.5.4.LAS COUMARINAS (A/BA+A/BB) INDUCEN UN PATRON DE FRAGMENTACIÓN DE DNA CARACTERÍSTICO DE APOPTOSIS	61
5.5.5.ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE CASPASA-3 EN CÉLULAS K562 TRATADAS CON LA MEZCLA DE LAS COUMARINAS	62
5.6. LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB NO INTERACCIONAN DIRECTAMENTE CON EL DNA	63
5.7.LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB INDUCEN ALTERACIÓN EN LA ULTRAESTRUCTURA MITOCONDRIAL	64
5.8.LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB INDUCEN UN INCREMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$	65
6. DISCUSIÓN	66
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	73
7.1.CONCLUSIONES	73
7.2.PERSPECTIVAS	74
8.REFERENCIAS	75
9.ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de fármacos derivados o directos de Productos Naturales aprobados por la FDA desde 1981-2010.	4
Figura 2. <i>Calophyllum inophyllum</i>	6
Figura 3. <i>Calophyllum brasiliense</i>	7
Figura 4. Coumarinas activas aisladas de diferentes especies del género <i>Calophyllum</i> .	12
Figura 5. Fases en el desarrollo farmacéutico.	17
Figura 6. Costo de producción de un fármaco nuevo en dolares .	17
Figura 7. Causas de fallas en el las distintas fases del Desarrollo Farmacéutico.	18
Figura 8. Reacciones de metabolismo de fármacos en el hígado.	22
Figura 9. Diagrama general de los estudios toxicogénomicos.	27
Figura 10. Investigación en toxicogenómica en los últimos años.	28
Figura 11. 1) Mameea A/BA-R1; 2) Mameea A/BB-R2; 3) Soulatrólido.	43
Figura 12. Análisis de PCA (principal component analysis) de los microarreglos.	50
Figura 13. Genes diferencialmente expresados en cada tratamiento.	50
Figura 14. Ejemplo de la red del motivo de apoptosis construida por las interacciones físicas entre proteínas (Interactoma) y enriquecida con los datos del control positivo APAP (Williams et al., 2004).	55
Figura 15. Histopatología Eosina-Hematoxilina de hígado, riñón y bazo de ratón tratado con Soulatrólido y Mameea A/BA + A/BB (100 mg/Kg/día-1 semana).	56
Figura 16. Histopatología de la tinción de PAS de hígado, riñón y bazo de ratón tratado con Soulatrólido y Mameea A/BA + A/BB (100 mg/Kg/día-1 semana).	57
Figura 17. Ensayo de TUNEL correspondiente a tejido de hígado de ratones tratados con Soulatrólido y Mameea A/BA + A/BB.	58
Figura 18. Citotoxicidad de la mezcla de Mameea A/BA + A/BB (3:1) en K562. Se determinaron 6 experimentos independientes con 6 réplicas cada uno para determinar un IC ₅₀ de 43.5±6 μM.	59
Figura 19. Ensayo de genotoxicidad (Prueba Cometa) de Mameea A/BA+A/BB en celulas K562.	60
Figura 20. Perfil de expresión transcriptómico de células K562 tratadas con Mameea A/BA+A/BB (3:1) a una concentración de 43.5 μM.	61
Figura 21. Patrón de fragmentación de DNA inducido por el tratamiento con la mezcla de Mameea A/BA+A/BB después de 24 h de tratamiento.	62
Figura 22. Actividad de Caspasa-3 inducida en celulas K562 tratadas.	63
Figura 23. Ensayo de interacción de DNA con Mameea A/BA+A/BB.	64

Figura 24. Las coumarinas inducen cambios morfológicos en la ultraestructura mitocondrial de las células K562.	65
Figura 25. Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ en células K562 tratadas con mezcla de Mameas.	66
Figura 26. Posibles blancos y mecanismo de acción de las coumarinas tipo Mamea A/BA + A/BB.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales metabolitos activos aislados de diferentes especies del género <i>Calophyllum</i> reportadas del 2010-2015.	8
Tabla 2. Principales actividades biológicas de las diferentes coumarinas aisladas en <i>C. brasiliense</i> .	15
Tabla 3. Bases de datos para análisis en toxicogenómica.	28
Tabla 4. Datos de RMN de 1H -y ^{13}C para la mezcla de coumarinas tipo Mamea A/BA+A/BB (3:1) aisladas de <i>C. brasiliense</i> .	44
Tabla 5. Datos de RMN de 1H -y ^{13}C para el Soulatrólido, aislado de <i>C. brasiliense</i> .	45
Tabla 6. Parámetros de fisicoquímicos Mamea A/BA and A/BB y Soulatrólido.	46
Tabla 7. Parámetros de bioactividad Mamea A/BA, A/BB y Soulatrólido.	47
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de Mamea A/BA, A/BB y Soulatrólido, Osiris Data Warrior.	47
Tabla 9. Actividades toxicológicas <i>in vivo</i> (Ratones CD-1).	48
Tabla 10. Análisis de calidad de RNA empleado en cada una de las muestras de los microarreglos.	49
Tabla 11. Cascadas de señalización enriquecidas de acuerdo a los resultados de los tratamientos con coumarinas en hígado de ratones tratados.	51
Tabla 12. Análisis de redes (interactoma) de los motivos funcionales correspondientes al tratamiento con coumarinas.	52
Table 13. Análisis de redes correspondiente a los motivos funcionales para los controles.	53
Tabla 14. Evaluación de la actividad citotóxica de la Mamea A/BA+A/BB sobre la línea celular K562 mediante el ensayo de MTT.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME-Absorción, distribución, metabolismo y excreción

Apom-Apoptosis

ADNd-Daño en el ADN

ADNc-Acido desoxirribonucleico codificante

ANOVA-Análisis de varianza de una vía

AcOEt-Acetato de etilo

APAP-Acetaminofen

clogP -Lipofilicidad

CYP-Citocromo

ChIP-Seq-Secuenciación de cromatina inmunoprecipitada

CC₅₀-Concentración citotóxica media

[Ca²⁺]_i-Concentración de calcio intracelular

DAPI-4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA-Acido desoxirribonucleico

DPPH-1,1-difenil-2-picrilhidacilo

DMSO-Dimetil Sulfoxido

DL₅₀ -Dosis letal media

DEGs-Genes diferencialmente expresados ya sea *upregulated* o *downregulated*

DB-Base de datos

ddq-Doble de dobles cuarteto

DL-Druglikeness

DS-Drugscore

downregulated-Genes desregulados a un Fold Change significancia estadística menor a 1.5

EC₅₀-Concentración efectiva media

FDA-Food and Drug Administration

GO-Ontología de genes

HE-Hematoxilina-eosina

HCD-1-Genes de referencia en la cepa CD-1

H-H-Lista de genes de referencia relacionados con hepatotoxicidad en ratón

HBA-Aceptor de puentes de hidrógeno

HBD-Donador de puentes de hidrógeno

h-Hora
ICH-Comité internacional de armonización
VIH-Virus de Inmunodeficiencia Humana
IC₅₀-50% de concentración inhibidora del crecimiento o actividad enzimática
I-T-Inmunotoxicidad
IR-Infrarojo
J, Hz-Constante de acoplamiento, Hertz
logS-Solubilidad
MHz-Megahertz
m-Multiplete
MIC-Concentración Mínima Inhibitoria
MTT-[3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]
mg/Kg-Miligramos por Kilogramo
min-Minutos
MS/MSⁿ-Espectroscopía de Masas acoplada a Masas
miLogP-Lipofilicidad
MW-Peso molecular
MET-Microscopio Electrónico de Transmisión
nM-Nanomolar ($1 \times 10^{-9} \text{M}$)
NOEL-Non observed adverse efect level (efectos adversos no observables)
NEM-Necrosis en ratón
Nrotb-Número de enlace rotables
ng/mL-Nanogramo por mililitro
ONU-Organizacion de las Naciones Unidas
O-S -Estrés oxidante
PAS-Ácido periódico de Schiff
PSA-Superficie de área polar
PCA-Análisis de componente principal
ROS-Especies reactivas de oxígeno
RT-VIH-1-Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo-1
RNA-Ácido ribonucleico
RNA-seq-Secuenciación de RNA
SSI-Solución Salina Isotónica

s-Singulete

TUNEL-Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

upregulated-Genes sobrerregulados a un Fold Change de significancia estadística mayor a 1.5

UV-Ultravioleta

v/v-Volumen sobre Volumen

1PPI-Primer interactor de proteína

2PPI-Segundo interactor de proteína

μM -Micromolar ($1 \times 10^{-6}\text{M}$)

μL -Microlitros

$\mu\text{g/Kg}$ -Microgramos por Kilogramo

^1H RMN-Resonancia Magnética Nuclear de protón

^{13}C NMR-Resonancia Magnética Nuclear de carbono -13

RESUMEN

Calophyllum brasiliense es un árbol de la familia Calophyllaceae que se distribuye en las selvas tropicales lluviosas del Continente Americano, sintetiza diversos metabolitos secundarios en hojas, flores, frutos, y corteza, con importantes actividades biológicas, entre ellos las coumarinas, *C. brasiliense* presenta dos quimiotipos diferentes con base en el tipo de coumarinas que biosintetiza. El primer quimiotipo biosintetiza coumarinas con un esqueleto 5,7-dioxicoumarinico denominadas de tipo Mammea como son: Mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/AO, C/OB, B/BA, B/BA ciclo F y B/BB ciclo F, entre otras, que presentan diversas actividades biológicas como: antiparasitarias, citotóxicas, y antimicrobianas. Particularmente, la Mammea A/BA y A/BB solas o en mezcla han presentado actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares (PC3, HTC116, y U251), y particularmente contra líneas celulares de leucemia humana (BV173, K562, NALM6, HL60, y SEM), induciendo además muerte celular tipo apoptosis en todas ellas. El segundo quimiotipo corresponde a las dipiranocoumarinas tetracíclicas, de las cuales los Calanólidos (Calanólido A, B, y C) y los Inófilums (A, C, D, E y Soulatrólido) han sido aislados en las hojas de *C. brasiliense*; estos compuestos presentan actividad específica contra la enzima RT-VIH-1, inclusive el Calanólido A presentó una inhibición de la replicación de este virus de 100 nM y alcanzó la fase clínica II. Particularmente, el Soulatrólido, presenta potencial como una molécula dual pues ha presentado actividad contra RT-VIH-1 ($IC_{50}=0.34 \mu M$) y contra *M. tuberculosis* (MIC=3.13 $\mu g/mL$). En este sentido, tanto las Mammeas A/BA, A/BB como el Soulatrólido, presentan potencial para ser tomados en cuenta como posibles fármacos. Por lo que los objetivos del presente estudio fueron, estudiar el potencial toxicológico de estos compuestos a través del uso de un protocolo toxicogénico (100mg/Kg/diario durante una semana) para evaluar el perfil transcriptómico de hígado de ratones expuestos a dichos compuestos, así como profundizar en el mecanismo de acción de las Mammeas A/BA y A/BB sobre la línea celular de leucemia K562. Como resultados del estudio toxicogénico pudimos identificar 46 genes *upregulated* y 72 genes *downregulated*, para el tratamiento con una mezcla de Mammeas A/BA+A/BB (3:1), mientras que 665 genes *upregulated* y 1077 genes *downregulated* para el Soulatrólido, el análisis de enriquecimiento identificó que la gran mayoría de estos genes estaban relacionados con metabolismo de fármacos y no con un perfil de expresión dañino, mientras que el análisis del interactoma de estos genes demostró un perfil donde ninguno de los compuestos generaba una red de interacción dañina. Estos estudios fueron validados por un análisis de TUNEL en hígado e

histología clásica (PAS y HE) de hígado, riñón, y bazo donde ningún compuesto presentó un perfil dañino, además, ambos compuestos presentaron una $DL_{50} > 3000$ mg/Kg en el ensayo de Lorke. Por otro lado, el análisis correspondiente al mecanismo molecular de la mezcla de Mamea A/BA+A/BB (3:1) en las células K562 permitió identificar que estos compuestos inducen la liberación de Ca^{2+} desde los 10 min de tratamiento, lo cual lleva a la inducción de muerte celular por apoptosis mediante la vía intrínseca, esto confirmado con análisis de ultraestructura mitocondrial y el perfil transcriptómico a las 3 h que indicó la sobre expresión de genes relacionados a esta ruta, confirmado por TUNEL a las 24 h e inmunofluorescencia de Caspasa-3 activa a las 18 h, todos estos estudios monitorizados por el ensayo cometa, en el cual se aprecia que a partir de la primer hora existe daño a DNA producto de la activación de estas rutas. Adicionalmente, los compuestos fueron evaluados *in silico* para demostrar su potencial fisicoquímico como posibles fármacos, como resultado, ninguno de los compuestos viola las reglas de Lipinsky, por lo que presentan potencial para ser empleados en la clínica.

ABSTRACT

Calophyllum brasiliense is a tree of Calophyllaceae family mainly distributed in the tropical rain forests of the Americas, synthesizes various secondary metabolites with important biological activities in leaves, flowers, fruits, and bark. Among these are the coumarins, *C. brasiliense* presents two different chemotypes based on the type of coumarins biosynthesized. The first chemotype biosynthesized coumarins with 5,7-dioxycoumarinic skeleton called Mammea-type such as: Mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/AO, C/OB, B/BA, B/BA cycle F and B/BB cycle F, among others, which exhibit various biological activities such as antiparasitic, cytotoxic, and antimicrobial. Particularly, the Mammea A/BA and A/BB pure or as a mixture present activity against various cell lines (PC3, HTC116, and U251), and especially against human leukemia cell lines (BV173, K562, NALM6, HL60, and SEM), inducing cell death throughout apoptosis. The second chemotype corresponds to tetracyclic coumarins, of which the Calanolides (Calanolide A, B, and C) and Inophyllums (A, C, D, E and Soulatrolide) have been isolated from leaves of *C. brasiliense*; these compounds have specific activity against the enzyme RT-HIV-1, even so Calanolide A showed inhibition of the replication of this virus at 100 nM and reached clinical phase II. In particular, the Soulatrolide presents potential as dual molecule since it exhibits activity against RT-HIV-1 ($IC_{50}=0.34 \mu M$) and against *M. tuberculosis* MIC = 3.13 $\mu g/ml$. In this sense both Mammeas A/BA, A/BB and Soulatrolide possess potential to be considered as potential drugs. So within the objectives of this study it was to study the toxicological potential of these compounds to assess its safety profile through the use of a toxicogenomic protocol (100 mg/kg/day for one week) to evaluate the transcriptome of liver from mouse exposed to such compounds. And delve in the molecular mechanism of action of Mammeas A/BA and A/BB on the cell line K562. As results from liver toxicogenomic study we identified 46 genes *upregulated* to 72 genes *downregulated*, for treatment with the mixture of Mammeas A/BA + A/BB (3:1), whereas 665 genes *upregulated* and 1077 genes *downregulated* for Soulatrolide. Enrichment analysis identified that most of these genes were related to drug metabolism and not harmful expression profile, while interactome analysis of these genes showed a profile where none of the compounds generated a harmful interaction network. These studies were completed with a TUNEL analysis of liver and classical histology (PAS and HE) from liver, kidney, and spleen, where non of the tested compounds present a harmful profile. On the other hand, both compounds showed an $LD_{50}>3000$ mg/kg in the Lorke

assay. Furthermore, corresponding to the analysis of the molecular mechanism of Mammaea A/BA + A/BB in K562 cells we identified that these compounds induce the release of Ca^{2+} after 10 min of treatment, which leads to induction of cell death by apoptosis through the intrinsic pathway, this was confirmed by the analysis of mitochondrial ultrastructure and transcriptome (3 h) which indicated the over-expression of genes related to this route, confirmed by TUNEL at 24h and immunofluorescence of active Caspase-3 at 18 h, all of these monitored by the comet assay, which shows that since 1 h there is DNA damage product of activation of these pathways. Additionally, compounds were evaluated *in silico* to demonstrate their as potential drugs as a result, none of the compounds violates Lipinsky's rules, and thus have potential for use in the clinic.

1.INTRODUCCIÓN

Aunque existe un gran avance en tecnología de secuenciación genómica y en biotecnología, las principales compañías farmacéuticas en el mundo, el llamado "*Big Pharma*", están enfrentado una fuerte crisis en el número de nuevas moléculas aprobadas para su uso en la clínica, numerosas enfermedades están desatendidas y el tratamiento es el mismo desde hace ya más de 20 años,(Rafols et al., 2014). Esto se debe principalmente a dos motivos: a un notable incremento en el costo de investigación y desarrollo de nuevas moléculas, derivado entre otras causas a que las tecnologías en química combinatoria no han logrado despegar y generar rápidamente nuevas moléculas activas como se esperaba desde principio de los 90's, y segundo porque muchas de las nuevas moléculas inducen efectos adversos y toxicológicos altamente dañinos para los pacientes, por lo que la gran mayoría tienen que ser retirados en las fases clínicas, lo que provoca grandes pérdidas monetarias para la industria farmacéutica,poniendo además en riesgo la vida de los pacientes de dichos estudios (Arrowsmith, 2011).

Dentro de las diferentes alternativas para resolver estos problemas, se ha propuesto retomar a los productos naturales,tanto de organismos terrestres como de organismos marinos, pues estos son el resultado de millones de años de evolución y adaptación a diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico, motivo por el cual son bioactivos desde su origen, pues han sido seleccionadas por la naturaleza para unirse a varias proteínas durante su ciclo de biosíntesis, para metabolizarse y degradarse(Newman & Cragg, 2012). Por este motivo, en general las estructuras de los productos naturales constituyen un buen principio para desarrollar nuevos compuestos o trabajar directamente con ellos, pues muchas de sus estructuras son bastante privilegiadas para el desarrollo de bibliotecas de nuevos compuestos activos. Recientemente Ertl y Schuffenhauer en 2008 probaron una base de datos de productos naturales que contenía cerca de 130, 000 moléculas incluyendo productos naturales marinos, y encontraron que solo un 10% de estos violaba la regla de los 5 de Lipinski (regla altamente utilizada en la industria farmacéutica para evaluar el potencial de nuevas moléculas con base en sus propiedadesfísicoquímicas). En su mayoría eran más lipofílicos que los fármacos comerciales actuales, por lo cual pueden atravesar fácilmente diferentes barreras fisiológicas (Peter Ertl & Schuffenhauer, 2008).

Por otro lado, dentro de las estrategias para evaluar el potencial toxicológico con mayor rapidez y eficacia, la toxicogenómica preventiva, ha sido propuesta como una valiosa y novedosa herramienta para su uso en estudios preclínicos. La toxicogenómica, se define como aquella rama de la toxicología encargada de estudiar la respuesta genómica de los organismos expuestos a diferentes agentes químicos. Al estudiar la respuesta con herramientas genómicas modernas podemos obtener una rápida predicción de cómo se comportará el organismo ante cierto estrés (Khan, Baghdasarian, Fahlman, Michail, & Siraki, 2014). En la última década el número de estudios toxicogenómicos se ha elevado e inclusive se ha madurado en el uso de nuevas herramientas como son: los microarreglos, el RNA-seq, así como diversas aproximaciones bioinformáticas (Römer et al., 2014), además del uso y diseño de bases de datos públicas con toda la información de los experimentos y sus resultados (Davis et al., 2013). Inclusive, existen diversos proyectos de distintas organizaciones gubernamentales y compañías farmacéuticas que trabajan en estandarizar estudios toxicogenómicos para sustituir a las pruebas clásicas de genotoxicidad, mutagenicidad y teratogenia convencionales, pues estos estudios representarían un menor costo, así como una mayor rapidez en la obtención de resultados (menos de 2 años) (Doktorova, Ates, Vinken, Vanhaecke, & Rogiers, 2014). Cabe destacar, que los avances en toxicogenómica son alentadores, pues con el empleo de nuevas tecnologías como la epigenómica, proteómica y metabolómica se vuelve más ágil y rápido el descubrimiento de nuevos biomarcadores de toxicidad y el desarrollo de nuevas moléculas.

En este contexto, en el presente trabajo se evaluó el perfil toxicogenómico y fisicoquímico de diferentes coumarinas (Mammea A/BA, A/BB y el Soulatrólido) aisladas del árbol tropical *C. brasiliense*, las cuales han presentado importantes actividades farmacológicas (citotóxicas, antiparasitarias y antituberculosas) (Huerta-Reyes et al., 2004b; Pires et al., 2014; Ruiz-Marcial et al., 2007) y que podrían en un futuro ser candidatos a estudios preclínicos o para el desarrollo de nuevas moléculas. Además, de profundizar en el mecanismo de acción molecular de las coumarinas tipo Mammea A/BA y A/BB sobre la línea celular K562 para conocer más acerca de los posibles blancos moleculares de este tipo de moléculas.

2.ANTECEDENTES

2.1. PRODUCTOS NATURALES Y DESARROLLO DE FÁRMACOS

A lo largo de la historia, los productos naturales han representado una fuente importante de elaboración de nuevos compuestos activos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Los productos naturales son una valiosa fuente para la industria farmacéutica en el descubrimiento de nuevas moléculas para elaborar: fármacos innovadores, fármacos semisintéticos, sintéticos, sintéticos/miméticos, compuestos para modelar mecanismos y blancos de acción farmacológica (farmacofóricos), y recientemente inclusive para el desarrollo de fitofármacos (fármacos cuyo principio activo es un extracto de plantas activo estandarizado por alguna metodología analítica con base en un metabolito biomarcador)(Butler, Robertson, & Cooper, 2014; Newman & Cragg, 2012). Sólo por mencionar algunos ejemplos de productos naturales que actualmente son utilizados en la clínica podemos referirnos: antibióticos como penicilina, tetraciclina, eritromicina; antiparasitarios como ivermectina, quinina y artemisina; antitumorales como docetaxel, paclitaxel, vincristina, vinblastina, y doxorubicina; inmunosupresores como ciclosporina y rapamicina; y recientemente la FDA aprobó los llamados "*Botanical Drugs*" o fitomedicamentos: VeregenTM que contiene un extracto estandarizado de *Camellia sinensis* y como componentes activo sincatequinas y el FulyzaqTM el cual contiene extracto de *Croton lechleri* y componente activo la protoantocianidina crofelemero como estos actualmente son recomendados para los tratamientos de verrugas genitales y diarreas asociadas a VIH respectivamente; además en Canadá, Alemania, Inglaterra y Nueva Zelanda fue aprobado SativexTM para su uso contra la esclerosis múltiple, este se compone de un extracto que contiene 9-tetrahidrocannabinol y cannabidiol (Cragg, Grothaus, & Newman, 2014).

Actualmente, se estima que cerca del 50% de los fármacos aprobados por la FDA tienen relación con los productos naturales ya sea de manera directa o como derivados de estos (Figura 1). Lo anterior indica que a pesar de los avances en química combinatoria y biotecnología, la influencia de los productos naturales sigue siendo importante para los avances en investigación en nuevas moléculas (Newman & Cragg, 2012).

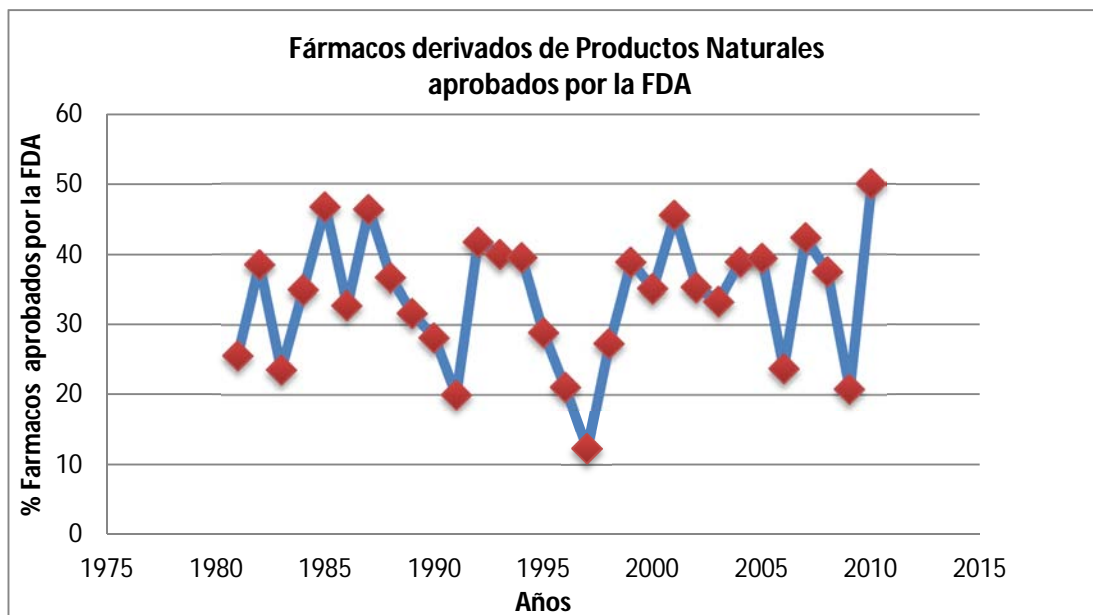


Figura 1. Porcentaje de fármacos derivados o directos de Productos Naturales aprobados por la FDA desde 1981-2010. (Newman, 2012).

En un estudio prospectivo publicado en 2014 por Butler y colaboradores acerca de fármacos provenientes de productos naturales (o derivados de estos) que se encuentran actualmente en fases clínicas, se reportaron que existen cerca de 23 compuestos en fase clínica III y cuando menos 8 en fases de documentación y de marketing, próximos a salir al mercado, por lo cual, los siguientes años serán cruciales para el desarrollo de nuevos medicamentos a partir de productos naturales (Butler et al., 2014). En este contexto, los rápidos avances en secuenciación genómica y biotecnología para manipular las rutas biosintéticas, así como los avances en metagenómica, pueden proveer una vasta e infinita fuente de nuevas moléculas activas (estimadas entre 1 y 20 x10⁶) derivadas de productos naturales que podrían ser útiles para el tratamiento de diferentes enfermedades (Li & Vederas, 2014).

2.2.CALOPHYLLUM SPP COMO FUENTE DE PRODUCTOS NATURALES

El género *Calophyllum* está compuesto por entre 180 a 200 especies de árboles tropicales que pertenecen a la familia Calophyllaceae, distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, América, Australia y las islas del Pacífico(Stevens, 1980), representa una fuente importante de productos naturales, pues contiene principalmente coumarinas y xantonas, con actividades biológicas importantes, tales como: citotóxicos, antivirales,

quimiopreventivo, antiseoretos, analgésico y antimicrobianas (Su et al. 2008; García-Zebadúa et al., 2011). La mayoría de las especies de este género se utilizan en la medicina tradicional de distintos países para tratar úlceras pépticas, malaria, diferentes tipos de tumores, diversas infecciones, enfermedades venéreas, controlar la presión arterial, como diuréticos, así como para el tratamiento del dolor e inflamación, entre otras (Cechinel Filho, Meyre-Silva, & Niero, 2009).

2.3 ANTECEDENTES BOTÁNICOS DEL GÉNERO CALOPHYLLUM

El género *Calophyllum* es bastante complejo y difícil de clasificar, inclusive la mayoría de los taxónomos que han estudiado este género hablan de la confusión y la frustración cuando se trata de diferenciar entre sus especies, ya que parece imposible establecer límites definitivos entre ellas (Standley, 1932). Según el sistema de clasificación APGIII (Angiosperm Phylogeny Group) (Group, 2009), el género *Calophyllum* está compuesto por cerca de 187 especies que pertenecen a una familia de plantas conocidas como Calophyllaceae anteriormente incluidas en la familia Clusiaceae. En el Viejo Mundo existen 179 especies, distribuidas principalmente en la región de Indo-Malasia, siendo la especie más importante *C. inophyllum*, y en el Nuevo Mundo sólo 8 especies, las cuales se encuentran distribuidas de México hasta Argentina y el Caribe, siendo *C. brasiliense* la más importante. (Díaz, 2013). La mayoría de las especies de este género son árboles de tamaño medio o grande, su hábitat es el bosque tropical húmedo de las tierras bajas; aunque algunos se encuentran en las zonas más secas o altitudes más altas.

Las características taxonómicas del género son (Stevens, 1980): tejido de corteza roja en forma de diamante, hojas dispuestas en oposición, con las venas paralelas estrechas que alternan con canales de resina como peciolos, la inflorescencia es un tirso de flores que crece a partir de las axilas de las hojas o en los extremos de las ramas, con florescencias terminales. En cuanto a las flores, los sépalos y pétalos pueden parecer similares y están dispuestas en verticilos, normalmente hermafrodita. El fruto es una baya (drupa) con capas delgadas de carne y una semilla bastante grande; que producen un látex blanco o amarillo (Figura 2 y 3).



Figura 2. *Calophyllum inophyllum*

2.4. QUÍMICA DEL GÉNERO CALOPHYLLUM

El primer análisis químico de *Calophyllum* fue un estudio en 1919 acerca de las propiedades fisicoquímicas del aceite de las semillas de *C. inophyllum*. Años más tarde, en 1950, Polonsky y Ormancey-Potier (Polonsky, 1957), determinaron la estructura química del inofilolido, el calofilolido y el ácido calofilico de esta misma especie. Posteriormente, varias especies han sido estudiadas, este género contiene en una amplia variedad de: triterpenos como fridelanos (fridelina, fridelano 3 β -diol, y canofilol), oleananos (ácido canofilico, y apetalactona), lupanos (ácido betulínico), taraxeranos (taraxerol y taraxerona) y adriananos (3 β -simiarenol) (Tran, 1996); xantonas aisladas de la madera de varias especies de este género como caloxantonas, A, B y C, caledonixantona A y B; compuestos fenólicos, aislados de partes aéreas como ácido gálico, ácido shikímico, y ácido protocatéquico; flavonoides aislados de hojas, corteza, frutos y látex de diferentes especies de este género como quercetina y, epicatequina; coumarinas de tipo Mammea, tricíclicas, tetracíclicas y diversas cromanonas (Tran 1996).



Figura 3. *Calophyllum brasiliense*

Interesantemente, las coumarinas y las xantonas se encuentran biogenéticamente relacionadas con diversas especies de este género, ya que la mayoría sólo son biosintetizadas por este género, inclusive algunos compuestos son utilizados como metabolitos biomarcadores y la mayor parte de las actividades farmacológicas atribuidas a este género se relacionan con el contenido de xantonas, coumarinas y cromanonas aisladas en las diferentes especies dentro de este género. La Tabla 1 presenta las principales actividades biológicas y principales metabolitos activos aislados reportados en dichas especies de 2010-2015 en la base de datos de Scopus™.

Tabla 1. Principales metabolitos activos aislados de diferentes especies del género *Calophyllum* reportadas del 2010-2015.

Especies	Metabolitos Aislados	Actividad biológica	Concentraciones	Ref.
<i>C. inophyllum</i>	Inofinina Inofinona Soulatrina, Filatrina	Efecto antiproliferativo contra linfocitos-B	^Δ 1.0-9.9 μg/mL	(Mah, Lian, Teh, & Sukari, 2015)
	Piranojacareubina Rediaxantona A Macluraxantona	Línea celular de carcinoma de Colón (LS174T)	^Δ 6.51–3.1 μg/mL	
	4-hidroxi-xantona Caloxantona C, Brasixantona B, Trapezifolixantona	Células de neuroblastoma humanas (IMR-32)	^Δ 5.53–72.0 μg/mL	
		Células de carcinoma de piel (SKMEL-28).	^Δ 6.51–75.0 μg/mL	
	Inofilina A	Induce apoptosis mediante estrés oxidante en células de Jurkat T de leucemia	^Δ 50 μM	(Chan et al., 2012)
	Calofilolido	Actividad Osteogénica	⁺ 30 μM	(Liu et al., 2015)
		Actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i>	⁺ 16 μg/disco	(Kalyanaraman et al., 2012)
<i>C. brasiliense</i>	GUT-70	Inhibición de la entrada de HIV-1 por modificación de la fluidez membranal	^Δ 10 μM	(Matsuda et al., 2015)

		Inhibición de las células de linfoma Hsp90	^Δ 1.5-6.3 μM	(Jin et al., 2011)
	Calanolido B y C	Inhibición de RT-HIV-1	^Δ 20.2 μg/mL	(García-Zebadúa, 2011)
	Mammea A/BB Mammea B/BB	Anti- <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	^Δ 31.2 and 62.5 μg/mL	(Pires et al., 2014)
	Mammea A/BA Mammea A/BB	Citotoxicidad contra células K562	[¥] 43.5 μm	(Gomez-Verjan, et al. 2014)
	Mammea A/BB	Actividad antileishmania <i>in vitro e in vivo</i> en ratones infectados	*18 mg/kg/day	(Tiuman et al., 2012)
		Alteraciones en la ultraestructura mitocondrial de <i>Leishmania amazonensis</i>	**7.4μM	(Brenzan et al., 2012)
	Soulamarina	Induce alteraciones a la función mitocondrial de <i>Trypanosoma cruzi</i>	[¥] 219 μM	(Rea et al., 2013)
	Xantona III Xantona V	Propiedades antioxidantes	[¥] 2.5 μM	(Blanco-Ayala et al., 2013)
<i>C. soulattri</i>	Soulatrina Caloxantona C Macluraxantona	Actividad Citotóxica contra: SNU-1, HeLa, Hep G2, NCI-H23,	[¥] 0.69-92.59 μM	(Mah et al., 2012)

	Brasixantona B Trapezifolixantona	K562, Raji, LS174T, IMR-32 and SK-MEL- 28		
	Filatrina Soulatrina Caloxantona C Brasixantona B Trapezifolixantona	Efecto antiproliferativo contra células Raji	^Δ 1.0-8.3μg/mL	(Mah et al., 2015)
Células de carcinoma de colón (LS174T)		^Δ 6.51–52.1 μg/mL		
Células de neuroblastoma (IMR- 32)		^Δ 7.31–72.0 μg/mL		
Células de carcinoma de piel (SK-MEL-28)		^Δ 7.31–75.0 μg/mL		
<i>C. flavoranulum</i>	Coumarina Flavoranula	Actividad contra <i>Plasmodium berghei</i>	^Δ 1.5x10 ⁻⁵ mg/mL	(Abbas, 2014)
<i>C. thorelii</i>	Calotorexantona 1,4,8-trihidroxixantona δ-tocotrienol 1,7-dihidroxixantona Globuxantona.	Actividad antioxidante en el ensayo DPPH de radicales libres	^Δ 13.63-17.46 μg/mL	(Le-Thu Thi Nguyen, Nguyen, & Nguyen, 2013)
	Torelionas A y B Oxitoreliona A	Actividad citotóxica contra células MCF-7	[¥] 7.4μg/mL	(Le-Thu T Nguyen et al., 2012)
		HeLa	[¥] 9.3 μg/mL	
		NCI-H460	[¥] 10.6 μg/mL	
<i>C. gracilipes</i>	Zeyloxantanona Gracixantona	Actividad citotóxica contra células:	[¥] 8.00-26.00 μM	(Asir, Ahmani, Haari, &Assim,

	Trapezifolixantona	MCF-7, HTC-116, PC3, VERO y RAW264.7.		2013)
C. <i>symingtonianum</i>	Xantonas, 1,3,5-trihidroxi-2-(3- metilbut-2-enil) xantona 6-desoxijacareubina	Actividad antifúngica contra <i>Gloeophyllum</i> <i>trabeum</i> , y <i>Pycnoporus</i> <i>sanguineus</i> .	^Ω 25μg-50μg	(Kawamura, Muhamud, Hashim, Sulaiman, & Ohara, 2012)

*Dosis que redujeron significativamente las lesiones cutáneas en las almohadillas plantares de ratones; ^YCC₅₀=concentración citotóxica (μM); ^AIC₅₀= 50% de concentración que inhibió el crecimiento o la actividad enzimática; ^MMIC= concentración mínima inhibitoria; ^EEC₅₀= Concentración que aumento la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) un marcador temprano de diferenciación de osteoblastos de la línea celular MC3T3-E1 (μmol·L⁻¹), ** LD₅₀ = dosis letal media.

2.4.1. COUMARINAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *CALOPHYLLUM SPP*

Diversos tipos de coumarinas (Figura 4) aisladas de este género han llamado la atención debido a sus propiedades anti-VIH, (como inhibidores no nucleósidos de la enzima RT-VIH-1) entre los que destacan principalmente: calanolidos, inofilums y cordatolidos. Por otra parte, los inofilums aislados principalmente de *C. inophyllum* también han mostrado ser activos contra el RT-VIH-1 por ejemplo, Inofilum B y P mostraron IC₅₀ de 38 y 130 nM, respectivamente (Patil et al., 1993). Finalmente, los Cordatolidos A y B aislados de *C. cordato-oblongum* mostraron una IC₅₀ = 12,3 y 19 μM respectivamente, en el mismo ensayo contra RT-VIH-1 (Dharmaratne, Wanigasekera, Mata-Greenwood, & Pezzuto, 1998).

Otro tipo de coumarinas activas aisladas de este género son las de tipo Mammea, como: Mammea A/BA, A/BB, B/BB, B/BA, Gut-70, entre otras, que han demostrado ser activas contra varios tipos de líneas celulares de Cáncer como: PC3, HTC116, U251 y seis líneas de células leucémicas humanas (BV173, K562, MALM 6, HL60, y SEM), en donde han demostrado inducir muerte celular mediada por caspasas en la mayoría de estas células (Ito et al., 2006; Reyes-Chilpa et al., 2004). Algunas de estas coumarinas (Mammea A/BA, A/BB, B/BB) también han demostrado ser activas contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania amazonensis* (Brenzan et al., 2007; Reyes-Chilpa et al., 2008), actuando mediante la inducción de hinchamiento mitocondrial y pérdida de la ultraestructura normal de este organelo (Brenzan et al., 2012). Además de estas actividades

existen otros reportes de coumarinas activas aisladas en diferentes especies de este género la Tabla 1, presenta algunos reportes de coumarinas aisladas en *Calophyllum* del 2010 al 2015.

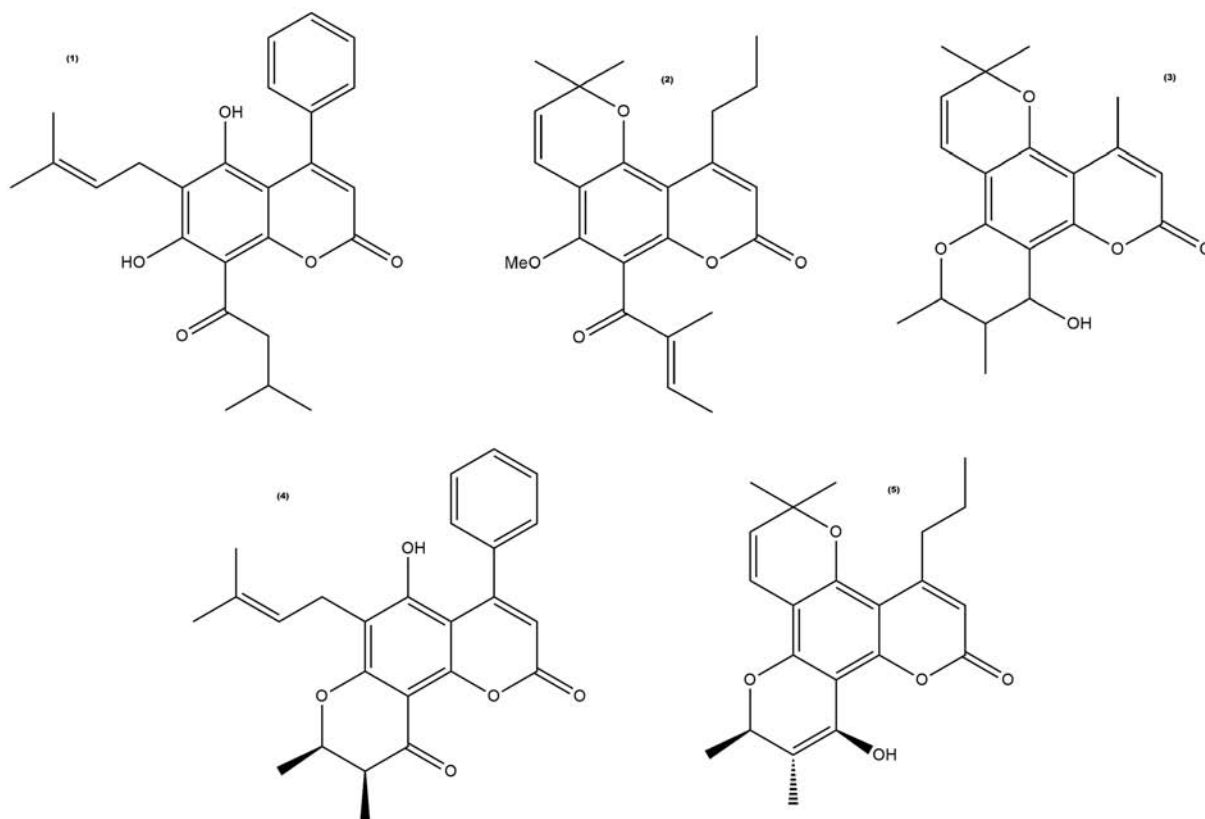


Figura 4. Coumarinas activas aisladas de diferentes especies del género *Calophyllum*. (1) *Mammea* A/BA; (2) Gut-70 (3) Cordatolido A (4) Calocoumarina A (5) Calanolido-A

2.5. CALOPHYLLUM BRASILIENSE

Calophyllum brasiliense (Calophyllaceae) es un árbol de la selva tropical húmeda, distribuido en el continente americano desde Brasil hasta el sur de México, que puede alcanzar entre 40 m de altura y 1-3 m de diámetro (Figura 3). Se ha usado en la medicina tradicional de diferentes países para el tratamiento de diversas enfermedades. En Brasil se conoce comúnmente como "*guarandi*", y se utiliza en la medicina tradicional para tratar el reumatismo, hemorroides varicosas, úlceras, inflamación y el dolor. En México, su nombre más común es "Bari", y la infusión de la corteza es consumida por las mujeres durante 9 días para "limpiar" el útero después del parto, las semillas proporcionan un aceite utilizado para la iluminación y para curar las afecciones de la piel. En Colombia, los campesinos llaman a este árbol "árbol de aceite", y el látex de color amarillo se

aplica por vía tópica para el tratamiento de los ombligos de niños recién nacidos. Existen además varios reportes acerca de otras actividades biológicas en la etnofarmacología de los diferentes países en los que se distribuye esta especie tales como: inflamación, herpes, enfermedades gastrointestinales, dolor, diabetes, infecciones virales y afecciones tumorales antimicrobianas, citotóxico, antineoplásico, antiespasmódico, antinociceptivo, y antiulceroso. (Cechinel Filho et al., 2009; García-Zebadúa et al., 2014)

Calophyllum brasiliense es la especie más estudiada del género *Calophyllum* en América (Gómez-Verjan, Gonzalez-Sanchez, Estrella-Parra, & Reyes-Chilpa, 2015), y una fuente importante de productos naturales de gran actividad (coumarinas, xantonas, flavonoides y terpénoides) que muestran propiedades farmacológicas muy interesantes como anti-RT-VIH, citotóxico, antineoplásico, antiparasitario, antiespasmódico, antinociceptivo, y antiulceroso (Brenzan et al. 2007; Pires et al. 2014; Brenzan et al. 2012; Abe et al. 2002; Reyes-Chilpa et al. 2008; Huerta-Reyes et al. 2004; Carmo Souza et al. 2009; García-Zebadúa et al. 2014). En particular, las coumarinas extraídas de las hojas de *C. brasiliense* son responsables de muchas de las actividades farmacológicas atribuidas a esta especie. En este contexto, se ha propuesto la existencia de dos fenotipos diferentes químicos (quimiotipos) en función del tipo de coumarinas que cada espécimen biosintetiza (Zavaleta-Mancera, Reyes-Chilpa, & García-Zebadúa, 2011). El primer quimiotipo (QT-1) de *C. brasiliense* sintetiza coumarinas tipo Mammea (5,7-dihidroxicoumarinas), como: Mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/AO, C/OB, B/BA, B/BA ciclo F, y B/BB ciclo F (Reyes-Chilpa et al., 2004). En particular, las Mammeas A/BA y A/BB (Figura 4) aisladas de las hojas de *C. brasiliense* han mostrado actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de Cáncer, tales como cáncer de próstata (PC3), carcinoma colorectal humano (HTC116) y glioblastoma (U251). Existen varios estudios que demuestran que este tipo de coumarinas son citotóxicas frente a líneas celulares de leucemia humana (BV173, K562, NALM6, HL60, y SEM) con IC₅₀'s en el rango de 0.04 hasta 0.59 μM, induciendo, en la mayoría de estas líneas celulares, muerte celular mediada por caspasas (Ito et al., 2006, Gomez-Verjan et al., 2014, Reyes-Chilpa et al., 2004). Por otra parte, Ruiz-Marcial y colaboradores describieron la actividad antiproliferativa y antitumoral de una mezcla de Mammea A/BA + A/BB-(2:1) en un modelo murino implantado vía dérmica con células de riñón de ratón del bebé (BMK), que muestra una inhibición hasta del 83% en el tamaño del tumor al cabo de cuatro semanas de tratamiento con dicha mezcla (Ruiz-Marcial et al., 2007). Además, las Mammeas A/BA y A/BB y una presentaron propiedades antiparasitarias contra

Trypanosoma cruzi (Reyes-Chilpa *et al.*, 2008) y *Leishmania amazonensis*, induciendo hinchamiento de la membrana mitocondrial y la alteración en la ultraestructura de este orgánulo (Brenzan *et al.*, 2007). Por otro lado, la Mammea A/BB ha mostrado una IC₅₀ de 82.51 µM en contra de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, así como contra varios aislados clínicos de esta bacteria con MIC's en el intervalo de 76.85 a 153.9 µM (Pires *et al.*, 2014).

El segundo quimiotipo (QT-2) de *C. brasiliense* corresponde al de coumarinas dipiranotetracíclicas, como Calanólidos (A, B, C, D, y E), Inofilums (A, B, C y Soulatrólido), Cordatólidos (A, B, C y E) y Cromanonas, (ácido apetalico) (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a). Este tipo de coumarinas dipiranotetracíclicas poseen actividad contra el VIH-1, inhibiendo la transcriptasa inversa de este virus. Inclusive, el Calanolido A presentó una inhibición de IC₅₀ de 100 nM (Kashman *et al.*, 1992), por lo que alcanzó la fase clínica II (Butler, 2005) donde se encontró que se toleraba bien y presentaba niveles terapéuticos aceptables en plasma, presentando efectos secundarios de baja intensidad, como dolor de cabeza y mareos (Creagh *et al.*, 2001). En lo que respecta a los inofilums aislados de esta especie, el más interesante es el Soulatrólido el cual es un potente inhibidor y específico de la RT-HIV-1 con una IC₅₀ de 0.34 µM y una muy notable especificidad, (Pengsuparp *et al.*, 1996). Además, el Soulatrólido, ha demostrado ser una molécula dual pues también es activo frente a *M. tuberculosis* (MIC=3.13 µg/ml), un patógeno comúnmente asociado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Xu *et al.*, 2004).

Existen numerosos reportes de fitoquímica de *C. brasiliense* brevemente: de la resina se han aislado los ácidos brasiliénico, e isobrasiliénico; de las raíces la 1,5-dihidroxixantona, el ácido betulínico y la friedelina; de las flores los ácidos gálico y protocatechúico; de los frutos los ácidos protocatequico y epicatequínico; de la corteza del tronco se han aislados diferentes xantonas como brasixantona A, B, C, D, E, F, G, toxiloxixantona A, 6-desoxijacareubina, 3,8-dihidroxi-1,2-dimetoxixantona, 8-desoxigartanina, cuadraxantona F, 4-hidroxixantona, 1,2-dimetoxixantona, piranojacareubina, y garcinina B. Por otra parte, de fracciones AcOEt de hojas se han aislado los polifenoles: quercetina, amentoflavón, hiperósido, ácido gálico y ácido proatechúico. Por último, de diferentes extractos polares y no polares de las hojas se han aislado diferentes tipos de coumarinas como: dipiranocoumarinas; Calanólidos A, B, C, D y E; Soulatrólido, y coumarinas del tipo Mammea como son: Mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/AO, C/OB, B/BA, B/BA ciclo F y B/BB ciclo F, entre otras.

2.5.1. COUMARINAS TIPO MAMMEA AISLADAS DE *CALOPHYLLUM BRASILIENSE*

Las coumarinas tipo Mammea aisladas de *C. brasiliense* (denominadas de esta forma por haber sido descubiertas en especies del género Mammea), son las coumarinas más interesantes farmacológicamente hablando (Reyes-Chilpa et al., 2004), pues presentan actividades citotóxicas y antiparasitarias (Tabla 1 y 2). Se han aislado principalmente de extractos de hojas (Mammea A/BA, A/BB, A/BD, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeigína). Además, en corteza se ha logrado identificar Mammea B/BB, y en frutos se han aislado Mammea A/BA y A/BB (García-Zebadúa et al., 2014).

2.5.2. COUMARINAS TETRACÍCLICAS AISLADAS DE *CALOPHYLLUM BRASILIENSE*

Las coumarinas tetracíclicas son compuestos estructuralmente relacionados entre sí, que difieren en el sustituyente del carbono C4, existen tres grupos: Calanólidos (prenilo en C4), Inófilums (fenilo en C4) y Cordatólidos (metilo en C4). Únicamente los Calanólidos y los Inófilums han sido aislados de *C. brasiliense*. Los Calanólidos A, B y C de extractos de hojas mientras que los Inófilums A, C, D, E y Soulatrólido aislados de extractos de corteza, hojas y ramas (García-Zebadúa et al., 2014). Existen, además otros tipo de coumarinas con actividades farmacológicas como GUT-70 (coumarina tricíclica) un potente citotóxico, (Kimura et al., 2005), y brasimarinas A, B y C, calofilólido, calanóna y calocoumarina A con propiedades antivirales (Filho et al., 2009). En la Tabla 1 y 2 se mencionan las actividades biológicas estudiadas en este tipo de coumarinas y la parte vegetal de la cual fuerón aisladas.

Tabla 2. Principales actividades biológicas de las diferentes coumarinas aisladas en *C. brasiliense*.

Tipo de Coumarina	Actividad biológica	Parte vegetal	Referencia
Coumarinas Tetracíclicas			
Calanólido A	Antiretroviral sobre RT- VIH-1 (IC ₅₀ =12-20µM)	Hojas	(Kashman et al., 1992)
Calanólido B		Frutos	
Calanólido C		Ramas	
Soulatrólido	Antiretroviral sobre RT- VIH-1 (IC ₅₀ =0.34µM) Actividad sobre <i>M.</i>	Hojas Ramas	(Pengsuparp et al., 1996)

	<i>tuberculosis</i> (MIC=3.13µg/mL)		
Coumarinas tipo Mammea			
Mammea A/BA	Antileishmaniasis, Citotóxico, antiespasmódico, antimicrobiano (<i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i>)	Hojas	(Brenzan et al. 2007; Gomez-Verjan, et al. 2014; Yasunaka et al. 2005; Reyes-Chilpa et al. 2006)
Mammea A/BB		Flores Frutos	
Isomammeigina	Citotóxico contra líneas tumorales humanas (MCF-7, PC3, SEM, U251)	Ramas	(Ito et al., 2006; Reyes- Chilpa et al., 2008)
Mammea B/BA, B/BB		Hojas	
Mammea B/BA ciclo F Mammea B/BB ciclo F		Flores Frutos	
Mammea C/OA Mammea C/OB	Bactericidas: <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>epidermidis</i> y <i>B. subtilis</i>	Hojas	(Yasunaka et al., 2005)
Mammea A/BA+A/BB		Ramas Hojas Flores Frutos	
Gut-70	Inhibición de 6 líneas de leucemia y en particular la línea celular resistente SEM	Hojas Ramas	(Jin et al., 2011)

2.6. TOXICIDAD EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS

El desarrollo farmacéutico está definido como el proceso de llevar un nuevo medicamento al mercado para su uso en la clínica. Comprende desde el descubrimiento de las moléculas activas a través de diferentes estudios (químicos, biológicos y de seguridad), seguido por las diferentes fases clínicas (I-III), su sometimiento a la autoridad regulatoria tanto a nivel nacional como internacional, su lanzamiento al mercado y los estudios de farmacovigilancia una vez que esta disponible a los pacientes (Fase IV) (Figura 5) (Theodosiou, Amir-Aslani, & Mégarbane, 2013).

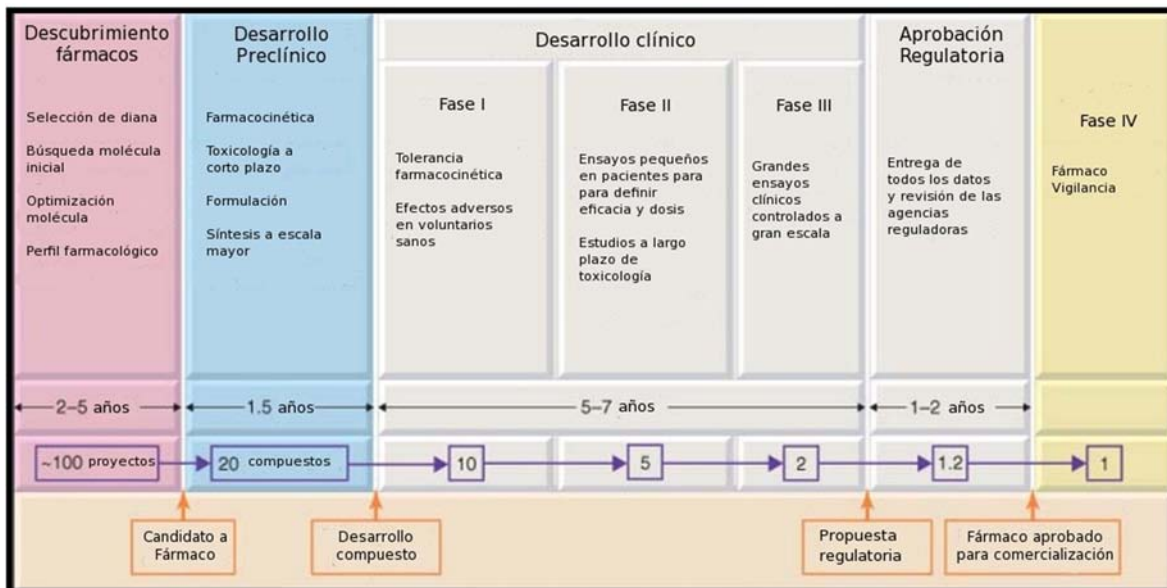


Figura 5. Fases en el desarrollo farmacéutico.

El costo de introducir un nuevo fármaco al mercado se ha acrecentado en los últimos años (Figura 6), a tal grado que a pesar del aumento en los presupuestos de investigación y desarrollo por parte del *Big Pharma* (industria farmacéutica transnacional), existe una crisis en el desarrollo de nuevas moléculas como potenciales fármacos (Rafols et al., 2014).

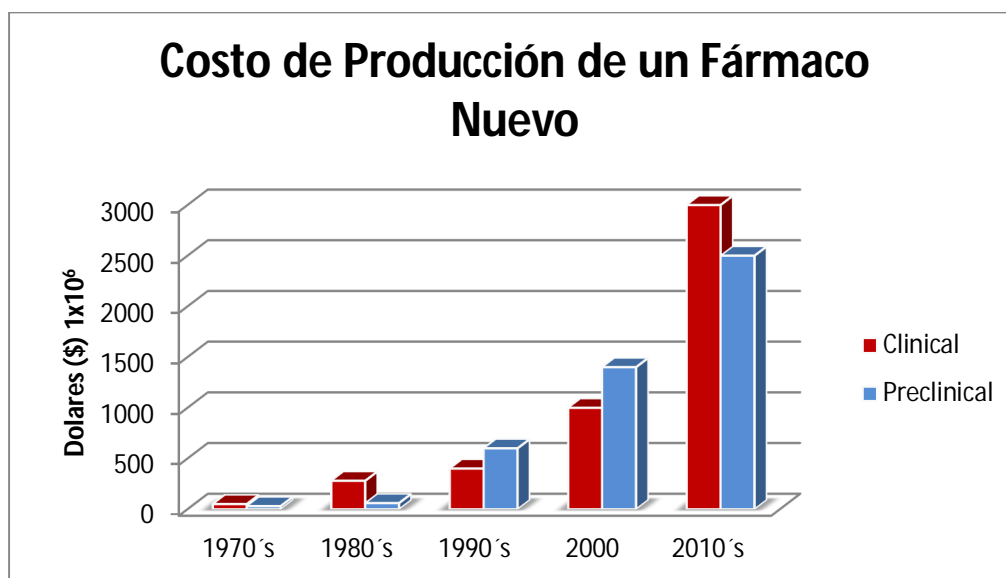


Figura 6. Costo de producción de un fármaco nuevo en dólares . Chemistry Views (2015).

Muchos son los factores que explican esta crisis de productividad, sin embargo, el principal y más importante de todos estos factores es el de seguridad (Keller, Pichota, & Yin, 2006). La toxicidad es el principal factor de fallo en el desarrollo de un fármaco durante las diferentes fases de su investigación. Se ha estimado inclusive que del 20-40% de las fallas de nuevas moléculas activas (Figura 7) en fases preclínicas se debe a diversos factores de toxicidad (Theodosiou *et al.*, 2013), alcanzando un 95% de fallas en las fases clínicas debido a efectos tóxicos inducidos por los nuevos fármacos (Arrowsmith, 2011).

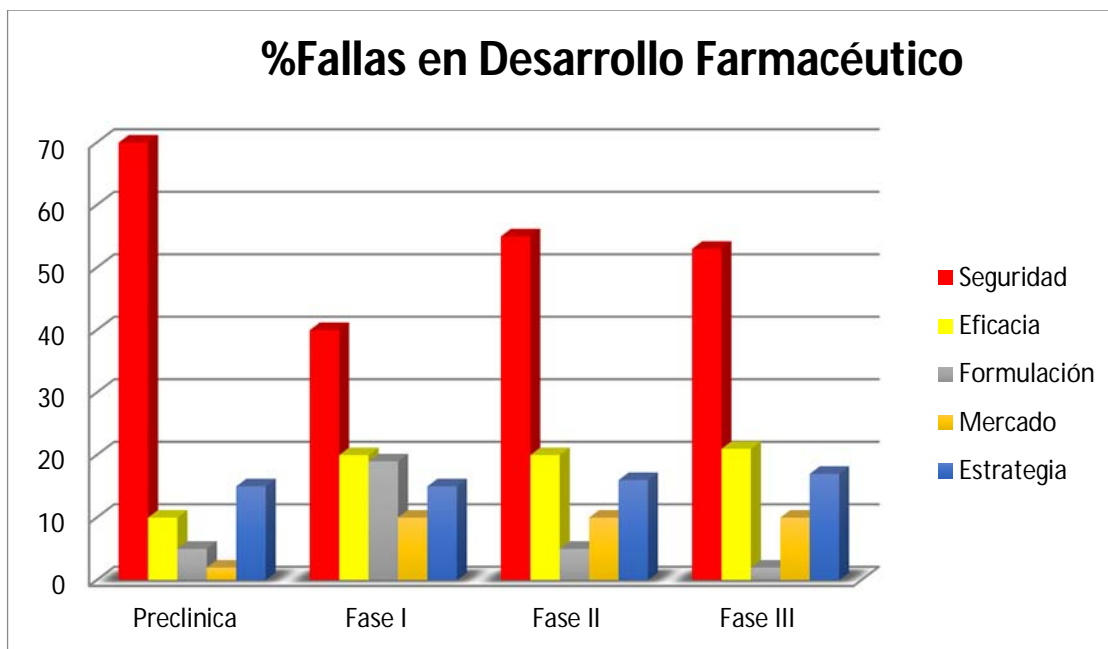


Figura 7. Causas de fallas en el las distintas fases del desarrollo farmacéutico. Chemistry Views 2015

Es importante destacar que todos los fármacos poseen un perfil toxicológico en particular, sin embargo, su margen terapéutico ($MS = \text{Eficacia} / \text{Seguridad}$) debe de ser lo suficientemente amplio como para poder utilizarse en la clínica, por lo cual es importante señalar que se debe estudiar adecuadamente factores como son la toxicocinética, y la toxicodinamia de un medicamento, pues de esta manera permitirá saber si podemos evitar o moderar su toxicidad mediante algún tipo de formulación o régimen de dosificación. El hecho de que un fármaco nuevo provoque efectos toxicológicos depende de muchos factores como pueden ser factores inherentes a la población blanco: la edad, el grupo étnico y el genotipo del paciente, algún tipo de afección previa (hepática o renal), dosis administrada, vía de administración, tipo de alimentación y si el paciente se encuentra tomando otros fármacos, por solo mencionar algunos ejemplos (Theodosiou *et al.*, 2013). De esta manera existen diferentes tipos de toxicidad inducida por un fármaco: efectos

toxicológicos directos sobre el blanco molecular o receptor (derivado de que los receptores muchas veces se encuentran en más de un tipo de célula o tejido), efectos toxicológicos ajenos al blanco molecular o receptor (derivado a que existen muchos receptores sumamente sensibles a las estructuras tridimensionales de los fármacos, principalmente a la parte farmacofórica de la molécula), efectos adversos mediados por el sistema inmunitario (derivados principalmente de alergias o hiperreactividad del sistema inmune: inmunotoxicidad), bioactivación de lo moléculas tóxicas (compuestos que una vez en el cuerpo son metabolizados por algún tipo de enzima (Figura 8) y los metabolitos resultantes presentan algún tipo de toxicidad) y respuestas idiosincráticas de las que se desconoce el mecanismo a través del cual inducen dicho efecto toxicológico (generalmente son respuestas adversas a un fármaco que se presentan de manera repentina en un grupo reducido de pacientes y cuya etiopatología es desconocida y que por lo general causan el deterioro de más de un órgano y pueden llegar a ser mortales) (Katzung, 2015). También pueden existir reacciones adversas derivadas de interacciones: Fármaco-Fármaco de carácter farmacocinético (que un fármaco altere el ciclo ADME de otro), Fármaco-Fármaco de carácter farmacodinámico (que un fármaco altere la expresión de los receptores de otro actuando en vías complementarias de manera sinérgica o en vías contrapuestas de manera antagónica), Fármaco-Xenobiótico (puede existir la interacción del compuesto activo con algún compuesto derivado de alimentos o de plantas)(Gámez, 2007).

2.7.MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDAD.

Dependiendo del tipo de toxicidad que puede ser inducida por un fármaco existen diferentes mecanismos moleculares de toxicidad (Katzung, 2015) a través de los cuales un fármaco puede inducir daño como son:

- **Citotoxicidad inducida por interacciones del fármaco:** este es el tipo de mecanismo de toxicidad más común inducida por los fármacos o sus metabolitos activos, se puede llevar a cabo en diferentes células lo cual puede desencadenar la pérdida completa de la función de distintos órganos. Se lleva a cabo principalmente por las rutas de muerte celular más comunes apoptosis y necrosis.
 - o **Covalentes:** Pueden afectar de manera significativa la función de diferentes enzimas pues la mayoría de este tipo de interacciones alteran el sitio activo de las

proteínas y por lo tanto, inducen inhibición enzimática o pérdida de función. Si existen formación de aductos pueden inclusive encender inmediatamente la activación de diferentes tipos de rutas de muerte celular.

- **No covalentes:** Este tipo de interacciones por lo general consiste en la inducción de la peroxidación lipídica, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), interacciones con grupos sulfhidrilos, interacciones de tipo fisicoquímicas que modifican la tensión superficial de distintos grupos enzimáticos, y que también pueden llevar a procesos de muerte celular de manera indirecta, por activación de alguna cascada de señalización.

- **Genotoxicidad:** Uno de los parámetros más importantes a evaluar en el desarrollo de nuevas moléculas son sus interacciones con la integridad del material genético. Aquellos compuestos que afectan negativamente el ADN pueden afectar no solo la integridad de una célula, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula, y por lo tanto ser potencialmente peligrosos para utilizarlos en clínica. Aunque la capacidad de una sustancia para dañar el ADN no la convierte automáticamente en un peligro para la salud, e inclusive en el caso de algunos compuestos activos contra el Cáncer, pueden ser parte de sus mecanismos de acción, lo importante es conocer si esta sustancia puede ser mutagénica, carcinógena y teratogénica.
 - **Carcinogenicidad:** Un carcinógeno es una molécula que potencialmente puede inducir neoplasias (Berkow & Fletcher, 1988), esto derivado de su potencial como genotóxico para causar daño directo sobre la integridad del genoma o para alterar de manera indirecta procesos metabólicos celulares normales que lleven a un descontrol en los procesos de división celular y por lo tanto a la formación de tumores. De acuerdo al Sistema Internacional de Armonización de la ONU, se pueden clasificar en 2 categorías, aquellos carcinógenos que estamos seguros que afectan al ser humano (Categoría 1), los basados en evidencias clínicas (Categoría 1A) y los basados en evidencias en animales de experimentación (Categoría 1B),

además de aquellos de los cuales sospechamos que son carcinógenos en humanos (Categoría 2).

- **Mutagenicidad:** Se define como la capacidad de un compuesto de inducir cambios de manera permanente y transmisible en la estructura del material genético de células y organismos (Maurici et al., 2015). Para asignar que un compuesto posee características mutagénicas se debe considerar, además de la inducción de mutaciones puntuales, otros cambios como son: la inducción de cambios en el número cromosómico (aneuploidía y poliploidía) o de cambios en la estructura cromosómica (rupturas, deleciones y rearrreglos).
- **Teratogenia:** Un teratógeno es un compuesto capaz de inducir o incrementar la incidencia de malformaciones congénitas en el embrión, derivado de la inducción de diferentes cambios que pueden ser desde epigenéticos, hasta mutaciones puntuales, o unión covalente a diferentes proteínas, o cascadas de señalización que interaccionen en el desarrollo normal de la embriogénesis (Knudsen, 2013).

2.7.1. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACOS

La hepatotoxicidad se define como: la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos (Tejada, 2010). Dado que el hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de nutrientes, fármacos y otros xenobióticos potencialmente tóxicos, los cuales deberán atravesarlo antes de alcanzar el torrente sanguíneo y por lo tanto a otros tejidos, lo hace particularmente susceptible a toxicidad.

La hepatotoxicidad representa un problema sanitario de primer orden en aumento en las últimas décadas, dado que es una de las principales causas de muerte secundaria a medicamentos y supone la principal causa del retiro, suspensión y restricción de productos farmacológicos. El daño hepático inducido por fármacos es la causa más común de muerte y representa alrededor del 10% de casos de fallo hepático agudo a nivel mundial (Gamez, 2007).

El metabolismo de los fármacos en el hígado se produce fundamentalmente en dos fases (Figura 6). Las reacciones de fase I consisten en reacciones de oxidación y reducción que modifican o

crean nuevos grupos funcionales, así como reacciones de hidrólisis que rompen los enlaces ésteres y amidas liberando también nuevos grupos funcionales (Katzung, 2015). A estos cambios sigue un aumento de la hidrosolubilidad de los metabolitos, lo cual facilita su excreción biliar y urinaria. Las reacciones de fase II (Figura 8) son reacciones de conjugación en las que el fármaco o un metabolito derivado del mismo se acoplan con substratos endógenos como el ácido glucurónico, acético o sulfúrico, que nuevamente generan metabolitos más solubles en medios hídricos facilitando de esta forma su excreción. La mayoría de los mecanismos celulares implicados en la lesión hepática tienen que ver con la generación de metabolitos reactivos durante las reacciones de biotransformación hepática de fase I controladas por el conjunto de enzimas microsomales conocido como citocromo P-450 (CYP 450). La ausencia de un determinado CYP o la presencia de polimorfismo en uno o varios CYP determinaría bien la inactivación del compuesto original (tóxico) o bien la formación de metabolitos aberrantes (Hartung, 2013).

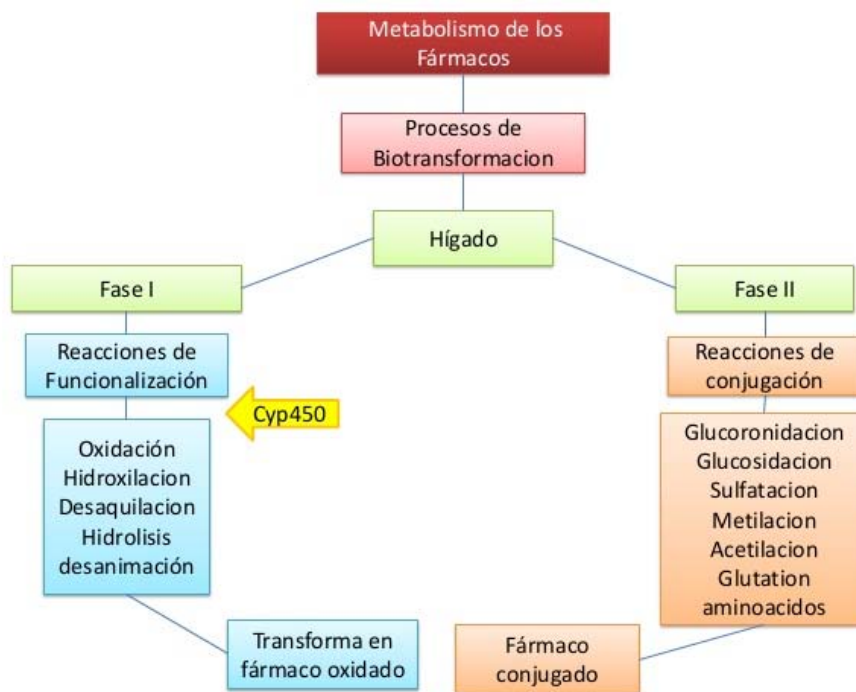


Figura 8. Reacciones de metabolismo de fármacos en el hígado.

Entre los daños que afectan al hígado se definen al menos, una de las siguientes alteraciones bioquímicas: 1) aumento de alanina aminotransferasa superior a dos veces el límite alto de la normalidad, 2) aumento de la concentración de bilirrubina directa sérica más de dos veces el límite alto de la normalidad, 3) aumento de aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y la

concentración total de bilirrubina, siempre que uno de ellos supere más de dos veces el límite alto de la normalidad (Tejada, 2010). Existen 2 tipos de hepatotoxicidad: intrínseca e idiosincrásica. La intrínseca, es la más importante pues es dosis dependiente y ocurre en una minoría de fármacos, puede consistir en compuestos que actúan directamente sobre el hepatocito, y/o a través de un compuesto tóxico generado durante su metabolismo por ejemplo el paracetamol (APAP). Otros ejemplos de hepatotoxicidad intrínseca, son aquellos producidos por el ácido acetilsalicílico, la intoxicación por setas (*Amanita phalloides*) o plantas y las alteraciones hepáticas producidas por productos industriales como el CCl₄ (Campos et al., 2014). En el caso de la hepatotoxicidad idiosincrásica, ocurre de modo impredecible, no se relaciona con la dosis y no es reproducible en animales de experimentación, se puede dividir en metabólica e inmunoalérgica y se desconocen los mecanismos en este tipo de hepatotoxicidad muchas veces se relaciona con determinados perfiles farmacogenómicos (Theodosiou et al., 2013).

2.7.2.METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE LATOXICOLOGÍA.

Para la evaluación de la toxicidad de nuevos fármacos se emplean diferentes baterías de ensayos en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, mismos que abarcan diferentes blancos de toxicidad, que van desde la evaluación de la toxicidad intrínseca en ensayos de toxicidad aguda, hasta la evaluación de sus posibles efectos tóxicos en diferentes sistemas y órganos completos mediante la conducción de ensayos denominados de toxicología especial, como son los estudios de genotoxicidad, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis (Gámez, 2007). El análisis general de los distintos resultados en estos estudios permite llegar a un criterio integral acerca de la toxicidad de un fármaco y sus posibles consecuencias. Las Conferencias Internacionales de Armonización (ICH), con el objetivo de garantizar la adecuada conducción de los estudios toxicológicos y armonizar internacionalmente los requisitos de registro sanitario, han definido criterios para ser considerados en el diseño de los diferentes estudios toxicológicos con base en la evidencia aportada por años de investigación en el campo de la toxicología (Barrow, 2009), de forma tal que se garanticen resultados confiables y reproducibles, y que se reduzca el número de animales empleados en este tipo de estudios, algunos de los ensayos toxicológicos más comúnmente empleados en la evaluación del potencial tóxico de nuevos fármacos son :

2.7.3. ESTUDIOS DE DOSIS ÚNICAS O DE TOXICIDAD AGUDA

Evalúan la toxicidad o efectos adversos producidos por un fármaco en una exposición a una sola administración en un periodo no mayor a 24 h y brinda información de toxicidad del posible riesgo que conlleva una exposición aguda al fármaco. Es una valiosa herramienta para determinar la dosis letal media (DL_{50}), definida como la dosis a la cual el fármaco causa la muerte del 50% de los animales bajo estudio, permite definir una posible dosis de toxicidad evidente y existen diferentes métodos para evaluarla como son Lorke, Test Limite y OCDE entre otros (Gámez, 2007).

2.7.4. ESTUDIOS DE DOSIS REPETIDAS

Posterior a los estudios de dosis únicas que le siguen estudios de dosis repetidas los cuales están definidos por la administración continuada de los fármacos el tiempo y tipo de estudio va a depender del país de registro y del tipo de tratamiento para el que se utilizará el fármaco, de manera general existen los siguientes (Gámez, 2007):

Toxicidad Subaguda: Consisten en la administración de dosis repetidas en un periodo de tiempo que puede ir entre 15 y 30 días. El objetivo es obtener los efectos adversos que ocurren como resultado de una dosis diaria repetida de un fármaco o sustancia química. El tiempo puede variar dependiendo del tipo de animales experimentales que se utilicen, este tipo de estudios permite establecer los niveles de dosis a utilizarse en los estudios crónicos y subcrónicos (Barrow, 2009).

Toxicidad Subcrónica y Crónica: Son los estudios en donde se observa los efectos adversos que ocurren como resultado de dosis repetidas con un fármaco nuevo o sustancia química sobre una administración diaria durante cerca del 10% de la vida de un organismo para estudios subcrónicos y durante la mayor parte de vida de un organismo (más del 50%) para estudios crónicos. Dependiendo del tipo de animal experimental, pueden llevarse generalmente un período de exposición de más de tres meses y hasta 3 años. Los estudios con exposición subcrónica permiten definir la dosis a la cual no se aprecia toxicidad relacionada con el fármaco (NOEL) y la dosis máxima tolerada, por otro lado, con los estudios de toxicidad crónica se puede evaluar efectos neurotóxicos, fisiológicos, bioquímicos y conductuales, es una de las pruebas más costosas en cuanto al desarrollo de

un fármaco y su diseño debe de ser muy especializado basándose en los estudios agudos y subcrónicos(Barrow, 2009).

2.7.5. ESTUDIOS DE TOXICIDAD ESPECIAL

Este tipo de ensayos se lleva a cabo en modelos experimentales como son microorganismos, cultivos primarios de células, órganos aislados y líneas celulares, suelen ser análisis muy especializados para identificar mecanismos moleculares de toxicidad (Eisenbrand et al., 2002).

Ensayos de Genotóxicidad : Son estudios en donde se observa la capacidad de un fármaco nuevo para causar daño al material genético; así como a todos aquellos componentes celulares relacionados con funcionalidad y comportamiento de los cromosomas, las pruebas más utilizadas son el ensayo de electroforesis alcalina en células individuales (ensayo cometa) y el ensayo de micronucleos.

Ensayos de Carcinogenicidad: Este tipo de estudios tienen por finalidad observar si el fármaco induce lesiones neoplásicas, ya sea mediante la activación de oncogenes o al afectar distintos factores de crecimiento, se emplean en diferentes modelos de animales genéticamente modificados para ser susceptibles a la inducción de tumores generalmente de las líneas Fisher y Sprague Dawly en ratas y CD-1 y OF-1 en ratones.

Ensayos de Mutagenicidad: son estudios en donde se observa el potencial de los compuestos para inducir mutaciones en el genoma: sustitución de bases o corrimiento de marco de lectura, el método más utilizado es el ensayo de incorporación en placa con *Salmonella typhimurium* o Test de Ames.

Ensayos de Teratogenicidad y sobre la Reproducción: son estudios acerca de los efectos de los fármacos en los sistemas reproductivos y neuroendocrinos del adulto en etapa reproductiva y el embrión en sus diferentes fases de desarrollo, este tipo de estudios se llevan a cabo en ratas y conejos preñados durante el periodo de la organogénesis(Gámez, 2007).

2.8.TOXICOGENÓMICA Y SUS APLICACIONES EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

Con el avance en el proyecto del genoma humano en los últimos años, existe un rápido crecimiento de las llamadas tecnologías "Omicas" y sus aplicaciones como: la transcriptómica (perfil de expresión genética completo; RNA-seq y microarreglos), la proteómica (perfil de expresión proteica completa electroforesis 2-D y espectroscopia de Masas acoplada MS/MSⁿ), la metabolómica (perfil de metabolitos secundarios ante una condición ambiental específica MS/MSⁿ y Resonancia Magnética Nuclear-RMN), la epigenómica (perfil de cambios y señalizaciones en el transcriptoma no relacionadas con la secuencia de ácidos nucleicos; ChIP-Seq), y la Interactómica (Biología de Sistemas). En este contexto, se han mejorado las herramientas de estudio en toxicología molecular, con lo que podemos analizar rápidamente los efectos adversos, rutas de señalización citotóxicas, modo de acción y blancos toxicológicos de las nuevas moléculas con potencial para entrar en la clínica (Currie, 2012).

Una de las aplicaciones más valiosas de los últimos años en Genómica es la Toxicogenómica, la cual ha surgido como una valiosa herramienta en el desarrollo farmacéutico. La Toxicogenómica se define como la rama de la toxicología encargada de identificar el potencial de las sustancias tóxicas y sus mecanismos de acción molecular, sobre los seres vivos, a través del uso global de los diferentes recursos genómicos (Ulrich & Friend, 2002).

La toxicogenómica se subdivide en tres: 1) Toxicogenómica Ambiental. Su objetivo es entender la relación entre el medio ambiente y la susceptibilidad del ser humano a este; 2) Toxicogenómica Preventiva. Su objetivo es identificar marcadores de exposición temprana a sustancias potencialmente tóxicas para prevenir moléculas peligrosas y 3) Toxicogenómica Mecanística. Su objetivo es ahondar en los mecanismos de acción molecular de los compuestos tóxicos (Capó & Frejo, 2007). En este contexto la toxicogenómica preventiva representa una de las herramientas más valiosas para los estudios preclínicos con moléculas nuevas pues permite discernir entre moléculas peligrosas. Los estudios típicos en Toxicogenómica Preventiva dependerán del enfoque y tipo de fármaco que se esté utilizando, pero de manera general consisten en el empleo de un régimen específico de dosificación con respecto a un control, siempre procurando el mínimo de animales (en algunas ocasiones inclusive pueden utilizarse distintos puntos en el tiempo para administrar de manera dosis-respuesta). En general un estudio de toxicogenómica dará como resultado un patrón de genes diferencialmente expresados para cada tratamiento y tipo de tejido

en estudio (Suter, Babiss, & Wheeldon, 2004), y a través de un análisis bioinformático podremos enriquecer el tipo y familia a la que pertenecen dichos genes para generar el interactoma de estos y tener un perfil toxicogenómico, que al compararlo en las diferentes bases de datos, pueda dar una idea clara de la seguridad en el empleo de dicho compuesto (Römer et al., 2014) (Figura 9).

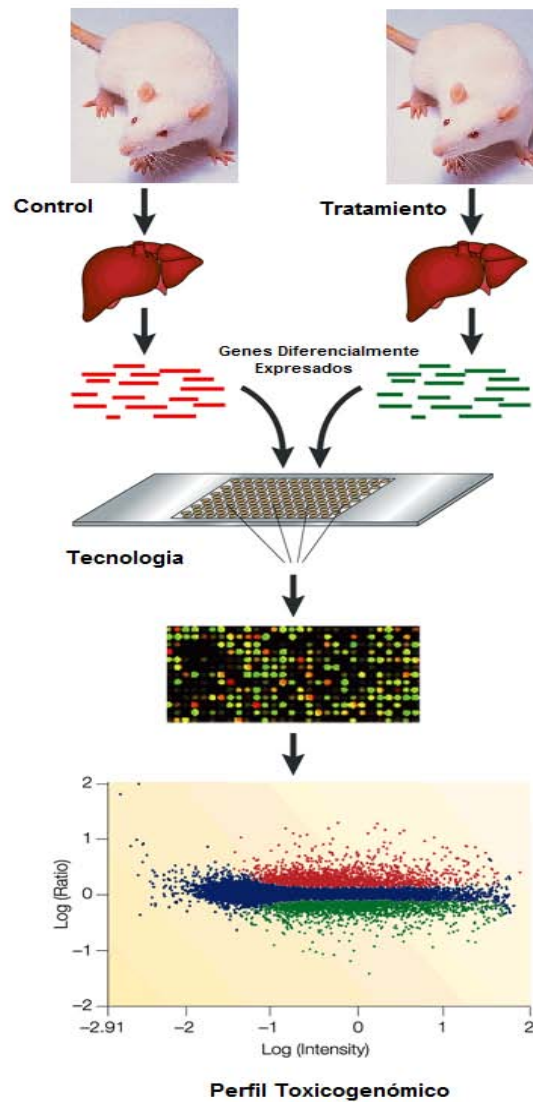


Figura 9. Diagrama general de los estudios toxicogenómicos.

Actualmente, existe un incremento en el número de estudios, bases de datos y aproximaciones bioinformáticas en Toxicogenómica (Amir-Aslani, 2008) (Figura 10), en los que se utilizan

principalmente el perfil toxicogenómico de hígado en roedores y que buscan utilizar la menor cantidad de animales. También se están utilizando líneas celulares de hepatocitos humanos (Boess et al., 2003) y cultivos primarios de hepatocitos de roedores con exposición a corto tiempo (3-14 días) (Fielden, Brennan, & Gollub, 2007), apoyados por distintas aproximaciones bioinformáticas que involucran el uso de la toxicología de sistemas. Entre otras cosas, se busca que estos estudios se puedan estandarizar, normalizar y validar, para poder sustituir los largos y costosos estudios de Genotoxicidad, Carcinogenicidad, Toxicidad Crónica y Toxicidad Subcrónica, mediante, la comparación de perfiles de expresión genética con otros perfiles provenientes bases de datos de estudios con diferentes clases de compuestos tóxicos previamente descritos y altamente estudiados en el ser humano (Doktorova et al., 2014). Por ejemplo, perfiles de benceno, formaldehído, arsénico, acetaminofeno solo por mencionar algunos. Actualmente se encuentran en diferentes servidores por todo el mundo, perfiles de expresión genética correspondientes a diferentes compuestos (Tabla 3).

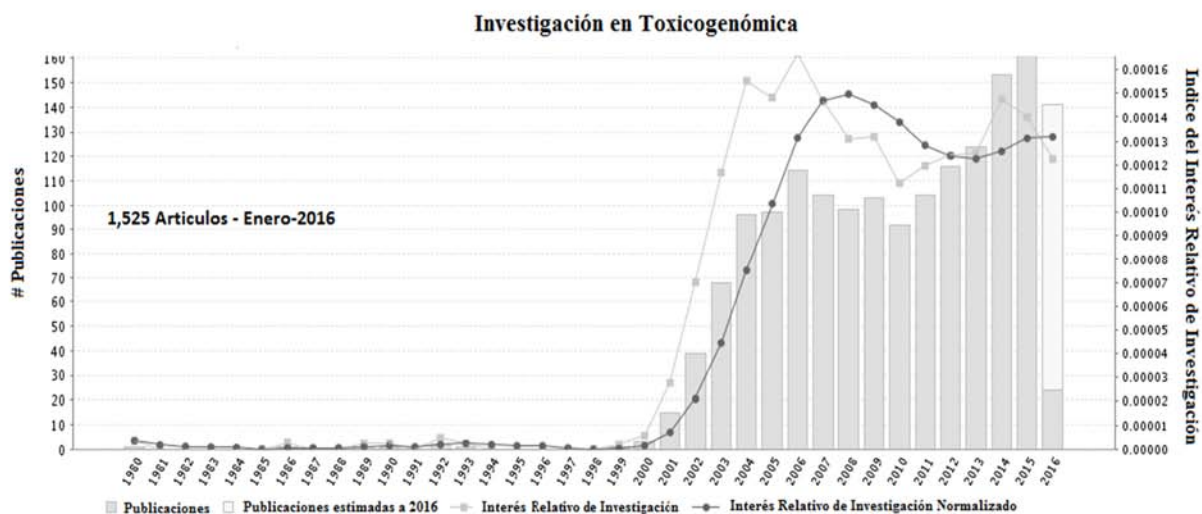


Figura 10. Investigación en toxicogenómica en los últimos años.

Tabla 3. Bases de datos para análisis en toxicogenómica.

Base de Datos	Generalidades	Ref
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	Base de datos que describe la relaciones entre: Compuestos Químicos/Fármacos/Genes/Proteínas/Enfermedades/Fenotipos/Taxones/ Términos GO/Interacciones y mantenida por el Depto. de Biología de la Universidad Estatal de Carolina del Norte: http://ctdbase.org/	(Davis et al., 2013)

Open Toxicogenomics Project- Genomics Assited Toxicity Evaluation Systems (TG-GATES)	<p>Es una base de datos libre parte del Proyecto Japonés de Toxicogenómica parte de una colaboración del Instituto Japonés de Salud y 15 compañías farmacéuticas internacionales contiene información de perfiles transcriptómicos de más de 170 compuestos en su mayoría fármacos y que además está asociado con histopatología: http://toxico.nibiohn.go.jp/opentggates/english/search.html</p>	<p>(Igarashi et al., 2014)</p>
DrugMatrix	<p>Es una base de datos que fue generada por Iconix Pharmaceuticals y liberada para su libre uso por el NIEHS, contiene datos de perfiles de expresión, histología, hematología y observaciones clínicas: https://ntp.niehs.nih.gov/drugmatrix/index.html</p>	<p>(Gee et al., 2003)</p>
InnoMed PredTox	<p>Es una base de datos de paga generada por 14 compañías farmacéuticas y 3 universidades europeas está especializada únicamente en hígado y riñón con una base de datos de 14 candidatos de fármacos y 2 compuestos de referencia: https://www.ebi.ac.uk/bioinvindex/browse_studies.seam</p>	<p>(Goldman, 2012)</p>
Gene Expression Omnibus (GEO)	<p>Es una base de datos libre para genómica funcional utiliza las reglas del MIAME para subir datos de expresión genética y es mantenida por el NCBI del NIH</p>	<p>(Barrett & Edgar, 2006)</p>
ArrayTrack	<p>Fue creado por la FDA mediante el National Center for Toxicogenomics Research, contiene base de perfiles de expresión genéticos, también contiene herramientas para búsqueda de compuestos con actividades sobre sistema endocrino, hígado, renal y control de calidad de los microarreglos de sus bases de datos: http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/Arraytrack/default.htm</p>	<p>(J. Xu, Kelly, Fang, & Tong, 2010)</p>

3.OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio toxicogenómico *in vivo* e *in vitro* de los efectos biológicos de las coumarinas tipo Mamea (A/BA+A/BB) y Soulatrólido aislados de *Calophyllum brasiliense*.

3.1.2.OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el perfil toxicogenómico de las coumarinas tipo Mamea (A/BA+A/BB 3:1) y Soulatrólido en hígado de ratones tratados a dosis de 100 mg/Kg expuestos durante una semana, agregando además los análisis histológicos de hígado, bazo, y riñón de animales tratados.
- Determinar la DL₅₀ de las coumarinas tipo Mamea (A/BA+A/BB) y Soulatrólido mediante la metodología de Lorke.
- Determinar el mecanismo molecular a través del cual las coumarinas tipo Mamea (Mamea A/BA+A/BB) ejercen su efecto citotóxico en las células K562.
- Evaluar el potencial de las coumarinas tipo Mamea (Mamea A/BA+A/BB) para ser empleadas en estudios clínicos mediante un estudio de toxicogenómica preventiva y herramientas *in silico*.

3.2. HIPOTESIS

"Las coumarinas tipo Mamea (A/BA+A/BB) así como el Soulatrólido presentaran un perfil de expresión seguro, así como un perfil histopatológico que no se encuentre asociado a daño en los ratones (CD-1) tratados"

" Las coumarinas tipo Mamea (A/BA+A/BB) poseen efecto citotóxico atribuible a la inducción de alguna de las rutas apoptóticas sobre la línea tumoral K562"

4.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1.COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Para su colecta el material biológico fue dividido en 2 con base en el quimiotipo del que se tratara :

Quimiotipo 1 (QT-1): Las hojas de *Calophyllum brasiliense* se recogieron en el Estado de Veracruz, México en Enero de 2014. Los vales fueron identificados y depositados en el "Herbario de plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social" (IMSSM) con los números 16131, 16132 y 16133.

Quimiotipo-2 (QT-2): Las hojas de *Calophyllum brasiliense* fueron colectadas en el Estado de Veracruz, Mexico, en Enero de 2014. Los vales identificados y depositados en el IMSSM con los números 16134 y 16135.

4.1.1.AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Mammea A/BA+A/BB (QT-1):

Las hojas correspondientes al QT-1 se secaron a temperatura ambiente y fueron trituradas mediante la acción mecánica de un molino (1 Kg). Posteriormente, el extracto fue preparado por maceración con hexano hasta agotamiento, y después se concentró "in vacuo" en un rotaevaporador. Los compuestos fueron aislados mediante el uso de cromatografía de columna fase normal sobre sílica gel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y se identificaron mediante las técnicas espectroscópicas convencionales de: ^1H RMN, ^{13}C RMN, IR, UV y comparados con la literatura (Crombie *et al.*, 1966, Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). El rendimiento de las coumarinas tipo Mammea se estimó en 1,5% de peso seco. Para los ensayos biológicos, se utilizó una mezcla de coumarinas tipo Mammea A/BA y Mammea A/BB en una proporción de 3:1. El contenido de cada compuesto en la mezcla se determina por RMN de ^1H usando integración de OH-7, y suponiendo 100% para ambos compuestos.

Soulatrólido (QT-2)

Las hojas correspondientes al QT-2 se secaron a temperatura ambiente y luego fueron trituradas mediante la acción mecánica de un molino (700 g). El extracto hexánico se preparó por maceración con hexano, hasta agotamiento y fue concentrado 'in vacuo' en un rotaevaporador y el disolvente residual se evaporó a sequedad a temperatura ambiente, el rendimiento del extracto

fue de 3% de peso seco. El soulatrolido se aisló usando la técnica de cromatografía en columna fase normal sobre gel de sílice 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), e identificado por las técnicas espectroscópicas de ^1H RMN, ^{13}C RMN, IR, UV y por comparación con lo reportado anteriormente para este (Gunasekera *et al.*, 1977). El rendimiento de coumarinas Soulatrólido se estimó como 1% de las hojas secas de peso.

IN SILICO

4.2. ANÁLISIS QUIMIOINFORMÁTICO DE COMPUESTOS

Osiris: Muchas moléculas que pretenden llegar a ser fármacos potenciales no llegan a la clínica debido a sus propiedades ADME. Osiris es un software de libre acceso que permite calcular ciertas propiedades fisicoquímicas que nos pueden dar una idea de estas propiedades para una molécula nueva (Htskuldsson, 1988). Entre estas propiedades encontramos: lipofilia, expresado como ClogP calculado por un algoritmo derivado de varios análisis de compuestos lipofílicos, solubilidad en agua, expresada como logS, peso molecular, índices de semejanza (*druglikeness*) y puntuación para ser un fármaco (*drugscore*). Además, de algunas estimaciones de sus posibles propiedades toxicológicas, como por ejemplo la posible interacción con CYP P450. Para evaluar el potencial de las coumarinas en estudio y sus posibles riesgos de toxicidad, utilizamos Osiris para calcular sus propiedades. La descripción completa del algoritmo de este software se puede encontrar en Brito, 2010 (Tabla 4).

Molinspiration: es también un software de libre acceso muy robusto capaz de procesar prácticamente todas las moléculas orgánicas, que también calcula diferentes propiedades fisicoquímicas, mediante una metodología en la que toma en cuenta la suma de contribuciones de cada fragmento O- y N- centrándose en fragmentos polares de la molécula y empleando diferentes factores de corrección, calcula: ClogP (coeficiente de partición octanol/agua) calculado por valores añadidos con base en cada fragmento de su estructura molecular, superficie de área polar molecular TPSA (P Ertl, Rohde, & Selzer, 2000), donadores y aceptores de protones, números de átomos y violaciones a la regla de los 5 (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 2001).

4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

IN VIVO

4.3.1. TOXICIDAD AGUDA (LORKE)

El estudio de toxicidad aguda se llevó a cabo de acuerdo con el método de Lorke utilizando ratones macho (cepa CD-1) (Charles River Laboratories International Inc. Hollister, CA, EE.UU. (Lorke, 1983). Brevemente, los materiales ensayados fueron: Los extractos hexánicos de QT-1 y QT-2, el Soutatrolido y la mezcla de Mameas (A/BA+A/BB 3:1). Los extractos se administraron por vía oral utilizando el aceite de maíz como vehículo (Mazola®). Como control se utilizó solución salina isotónica (SSI). Los compuestos se disolvieron en DMSO y se diluyeron con agua (5% v/v). El estudio se realizó en 2 fases. En la 1ª fase de prueba dosis fueron 10 100 y 1000 mg/kg de peso corporal. En la 2ª fase, dosis específicas (1600, 2900 y 5000 mg/kg) de cada compuesto fueron administradas a un ratón por dosis para determinar el valor DL₅₀. Los ratones se dividieron en grupos de 3 animales por dosis. Todos los animales se observan con frecuencia en el día del tratamiento y los animales supervivientes se monitorearon diariamente durante 2 semanas para evaluar si existían signos de toxicidad aguda. Al cabo de 14 días, todos los ratones supervivientes se sacrificaron y a continuación se realizó la autopsia, los órganos blanco (hígado, cerebro, bazo, riñón, corazón, testículo) fueron examinados macros y microscópicamente para evaluar cambios patológicos. Los pesos de estos órganos también fueron tomadas y comparadas con las del grupo de control.

4.3.2. ESTUDIO TOXICOGENÓMICO

Se emplearon un total de 12 ratones machos de la cepa CD-1 (*Mus musculus*) (Charles River Laboratories International Inc. Hollister, CA, EE.UU.) con un peso corporal de 25±4 g, y dos meses de edad, proporcionados por la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (12h luz/oscuridad y 27±2 °C) en cajas ventiladas y alimentados con RatChow™. Los animales se dividieron en tres grupos de acuerdo con el tratamiento: 1) Soutatrolido, 2) Mezcla de Mameas (A/BA + A/BB 3:1) y 3) Control (SSI). Los tratamientos fueron administrados por vía oral durante una semana a una dosis de 100 mg/Kg/diariasiguiendo un protocolo toxicogenómico de exposición a corto plazo (Fielden et al., 2007). Los compuestos se

disolvieron en DMSO y se diluyeron con agua (5% v/v), el grupo control recibió solución salina isotónica al 0,9% (SSI). Todo el trabajo con los animales fue dirigida en estricta conformidad con las normas nacionales e internacionales pertinentes. El protocolo de estudio IG-2005-13 fue aprobado por el Consejo de Bioética de la Facultad de Medicina de la UNAM. El hígado de los ratones fue extraído inmediatamente después de la última administración, y procesado con el Kit PureLink® RNA Mini (Life Technologies, Carlsbad CA, EE.UU.) para obtener ARN. La cantidad total de ARN se determinó por espectrofotometría utilizando el dispositivo Nanodrop®2000 (ThermoScientific, Waltham MA, EE.UU.) y su integridad fue evaluada usando un Bioanalyzer® (Agilent, Waldbronn, Alemania). La síntesis de DNAc, la hibridación, el lavado, la tinción del microarreglo, así como el escaneo de la matriz de sondas se realizaron de acuerdo con el protocolo estándar de la 3'IVT expression Kit (Affymetrix, Santa Clara CA, EE.UU.). El microarreglo utilizado fue Gene Chip de 1.0 Array de Affymetrix de ratón, utilizando tres microarreglos por tratamiento y un pool de tres experimentos biológicos por tratamiento.

4.3.2.1. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS DE LOS MICROARREGLOS

Las intensidades de señal de cada microarreglo se analizaron mediante el software Partek Genomics Suite 6.4 (Partek Inc. de St. Louis, Missouri, EE.UU.). Los valores de intensidad de cada sonda en bruto se normalizaron mediante un análisis robusto multiarray (RMA) para la corrección del ruido de fondo. Un ANOVA de dos vías se realizó para identificar los genes expresados diferencialmente (DEGs). Sólo los genes con los niveles de expresión con diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$) se incluyeron en el conjunto final de los genes expresados diferencialmente el criterio fue un fold change de ≥ 1.5 y ≤ -1.5 . Los datos generados por los microarrays fueron depositados en la base de datos pública Gene Expression Omnibus (GEO: GSE72755) y en el artículo de datos (J C Gomez-Verjan et al., 2015).

4.3.2.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO

La lista de genes DEG's fueron utilizados como listas de entrada para la herramienta on line DAVID Functional Annotation Clustering tool (Huang, Sherman, & Lempicki, 2008). Este software de código abierto proporciona un análisis de enriquecimiento de anotación y de ontología de genes (GO) sobre la base de términos GO Term Finder, que encuentra los términos más importantes compartidas en una lista de identificadores relacionados con diferentes procesos biológicos. El valor p-correctado se obtiene aplicando la corrección de Bonferroni. El análisis de enriquecimiento

también fue llevado a cabo mediante el uso de la base de datos Comparative Toxicogenomics Database (CTD), que contiene datos acerca de las interacciones fármaco-enfermedad (Davis et al., 2013).

4.3.2.3. ANÁLISIS DE REDES (INTERACTOMA)

Para el análisis de redes (Network Directed Strategy to Toxicity Prediction): definimos un conjunto de motivos funcionales, sospechosos de estar involucrados con hepatotoxicidad inducida por fármacos, tales como apoptosis (Apom); daño en el ADN (ADNd); genes de referencia en la cepa CD-1 (HCD-1); necrosis del ratón (NEM); estrés oxidante (S-S); InmunoToxicidad (I-T) y una lista de genes de referencia relacionados con hepatotoxicidad en ratón (H-H); (Williams et al., 2004).

- **Generación del interactoma:** para contextualizar los genes "semilla" en cada motivo de redes funcional, generamos una red con los interactores directos de nuestras semillas (1er nivel-1 PPI) y interactores de interactores directos (2do-nivel 2-2PPI). Las interacciones físicas entre las proteínas se obtuvieron a partir de una base de datos integrada que contiene datos de PPI de los nueve principales bases de datos públicas: Intacto, menta, DIP, Matrix DB, InnateDB, BioGrid, BIND, MPIDB y HPRD.

- **Gene Set Enrichment Analysis (GSEA):** para cada motivo de la red (interactoma) relacionados entre si es decir motivo expandido ampliado mediante la inclusión de 1PPI y 2PPI a partir de las semillas predefinidas se realizó un análisis funcional de enriquecimiento (Subramanian et al., 2005) con el objetivo de identificar el grupo de genes (DEG's) procedentes de los microarreglos de bajo las diferentes condiciones toxicológicas (valor de significancia de $p < 0.01$).

Con el fin de validar que nuestros motivos se pueden determinar toxicidad utilizamos la base de datos ArrayExpress para obtener perfiles toxicogenómicos en ratones CD-1 tratados con paracetamol (APAP) (Williams et al., 2004) y CCl_4 , como controles positivos para toxicidad. Utilizamos los datos obtenidos en dichos estudios para las 8 h con APAP y a las 8 h CCl_4 , como control negativo utilizamos los datos obtenidos a partir de los 16 días después del tratamiento con CCl_4 (Campos et al., 2014).

4.3.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO (EOSINA-HEMATOXILINA; PAS Y TUNEL)

Histología (hígado, bazo y riñón)

Los órganos hígado, riñón y bazo se fijaron en 4% de formalina tamponada con fosfato (pH=7.4) durante 24h y luego se incluyeron en parafina. Las secciones se cortaron en rodajas de 5- μ m de espesor y se utilizan para la tinción con hematoxilina-eosina rutinaria (HE) (Feldman & Wolfe, 2014) y ácido periódico de Schiff (PAS) (Herzog *et al.*, 2007). Los portaobjetos se analizaron y evaluaron en manera de doble ciego por el patólogo, con un microscopio óptico para evaluar la arquitectura general y lesiones.

Detección *in situ* de apoptosis

Se utilizó el ensayo TUNEL, siguiendo protocolo del inserto (Roche Life Science, Mannheim, Alemania). Brevemente, las secciones de hígado se desparafinaron, se deshidrataron, y se procesaron para identificar las células TUNEL positivas mediante la visualización de la fluorescencia verde por la interacción de la fluoresceína-12-dUTP y la fluorescencia roja de yoduro de propidio bajo un microscopio Nikon (Nikon Instruments Inc. Melville, NY, EE.UU.) $\lambda > 620$ nm. Una sección de hígado tratada con DNasa I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) se utilizó como control positivo.

IN VITRO

4.4. CITOTOXICIDAD EN CELULAS K562

Se calculó la concentración inhibitoria media (IC_{50}) en la línea tumoral humana K562 (línea de células de leucemia humana). La línea celular K562, fue cultivada en un medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (10%), inactivado por calor. Se le agregaron los siguientes: 100 U/mL de penicilina G, 100 U/mL de sulfato de estreptomycinina y 0.25 anfotericina B (Invitrogene Carlsbad, CA, EE.UU.). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ (González-Sánchez *et al.*, 2011).

La citotoxicidad fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol], en 6 experimentos independientes. Para esto, las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos, a una concentración de 7×10^3 células/pozo. Cada pozo con 200 μ L de

medio de cultivo. Al cabo de 24 h, las células fueron tratadas con la mezcla de Mameas (A/BA+A/BB 3:1) a concentraciones suficientes para completar una curva dosis respuesta (0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M). Como vehículo se utilizó DMSO, procurando mantener un volumen de 50 μ L por pozo, hasta un volumen final de 250 μ L, determinando la viabilidad celular a las 48h, al cabo de las cuales se agregó cada pozo 20 μ L de una solución de MTT (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), a una concentración de 2.5 mg/mL, en medio PBS, (pH=7.2). Posteriormente (2h), se retiró el MTT y se añadieron 200 μ L de DMSO a cada pozo. Finalmente, se leyó la absorbancia a 540 nm utilizando el aparato Synergy® 2 Multi-Mode lector de microplacas, BioTek® (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). La cantidad de formazán detectada es proporcional al número de células vivas, y la inhibición del crecimiento celular se determinó por la siguiente fórmula: Inhibición del crecimiento celular (%) = $(1 - \text{absorbancia de células tratadas} / \text{absorbancia de células no tratadas}) * 100$.

Los datos presentados son el resultado de 3 experimentos independientes con seis repeticiones por cada grupo experimental. Los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) del crecimiento celular se determinó a partir de curvas de inhibición de concentración/viabilidad utilizando una regresión no lineal (constante de Boltzman) con el software OriginPro 7.0™; (OriginLab, Northampton, MA, EE.UU) (González-Sánchez et al., 2011).

4.4.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CELULAS K562 EN TRATAMIENTO

4.4.1.1. AISLAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE RNA

Las células tratadas con la mezcla de Mameas (A/BA+A/BB 3:1) al cabo 3 h tratadas a 43.5 μ M fueron sometidas a extracción de RNA mediante el método de extracción procesado con el Kit PureLink® RNA Mini (Life Technologies, Carlsbad CA, E.U.) para obtener RNA. La cantidad y pureza del RNA se determinaron midiendo la densidad óptica a 260/280 nm en un espectrofotómetro UV. La calidad del RNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa y rRNA 28S / 18S > se obtuvieron 1,7.

4.4.1.2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE DNA DE CÉLULAS K562

Los microarreglos de DNA fueron producidos en la plataforma de microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular utilizando 5 mil oligonucleótidos de tamaño de 70-mer (matriz-Ready rata oligo Establece vers. 1.0, Operon Biotecnologías, EE.UU.). La impresión de los arreglos, la

preparación de la sonda, la hibridación, escaneado de imágenes del arreglo y el análisis de datos se describen en detalle por Luna-Moreno et al. (2007). Brevemente, 10 µg de ARN total combinado (5 experimentos independientes con 3 replicas cada uno) se utilizaron para la síntesis de DNAc que incorpora dUTP-Cy5. DNAc marcado con Cy3-dUTP célulastratadas con SSI (controles) se utilizó como referencia común. En cantidades iguales de DNAc Cy5 y Cy3-marcadose hibridaron con los arreglos. Las imágenes de los arreglos se analizaron con el software ArrayPro (Media Cybernetics, Inc., WT, EE.UU.). La corrección de fondo, la normalización y la selección de genes expresados diferencialmente se realizaron con el software GenArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). Los genes expresados diferencialmente fueron seleccionados de acuerdo a la puntuación del valor Z, esta función identifica diferencial de los genes expresados mediante el cálculo de una puntuación (Z) dependiente de la intensidad, que mide el número de desviaciones estándar (DE) de la media(Luna-Moreno, Vázquez-Martínez, Báez-Ruiz, Ramírez, & Díaz-Muñoz, 2007). Se consideraron genes *upregulated* cuando $Z\text{-score} > 2$ DE o *downregulated* si $Z\text{-score} < -2$.

4.4.2. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD

4.4.3. ELECTROFORESIS DE CELULAS EN GEL DE AGAROSA (ENSAYO COMETA)

Las células K562 se sembraron en placas de caja Petri de 60×15 mm (Corning Inc., NY, E.U.) en un número de 2×10^4 células por placa y se trataron con la mezcla de Mamea (A/BA+A/BB 3:1), a una concentración previamente evaluada (43.5 µM), durante 1, 3 y 12 h. Como control positivo se utilizó el peróxido de hidrógeno (10% v/v) durante 15 m, ya que produce rompimiento en la doble cadena de ADN, aun a concentraciones milimolares (Tice et al., 2000). El ensayo cometa (versión alcalina) se realizó de acuerdo a Singh *et al.* (1988). Brevemente, después del tratamiento con la mezcla de Mameas, las células fueron concentradas con EDTA y posteriormente, se tomaron 2 mL de esta suspensión y se homogeneizó con 300 µL de gel de agarosa de bajo punto de fusión (0.8 % m/v), en un portaobjetos. Enseguida, se embebió en una solución de lisis (2.5 mol de NaCl, Na₂EDTA 100 mM, 1% de Tritón X-100 y 10% DMSO). Dejándose 15 min, al cabo de este tiempo se lavó el gel en cinco ocasiones en una solución amortiguadora (Buffer 1X). Posteriormente, en una cámara de electroforesis se vertió una solución tampón (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA pH=13.0, 4°C), para enseguida introducir el gel de agarosa y llevar a cabo la electroforesis a 300 mA durante 20 min. Luego se retiró el gel de agarosa y se embebió en una solución tampón de neutralización

(0.4 M Tris-HCl a pH=7.5), en tres ocasiones durante 15 min cada ocasión. Enseguida, los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 5 min antes de la tinción con 5 μ L de gel red (1:50,000). Las microfotografías de los cometas se visualizaron y se fotografiaron usando un microscopio de fluorescencia de acuerdo a Lu *et al.* (2010) Nikon (Nikon Instruments Inc. Melville, NY, E.U.). La medida del porcentaje de daño al ADN se determinó como el momento de la cola (% tailDNA) y se determinó por la fórmula: 100-(% de la cabeza del ADN) (Ayala, Gonz, & Ndez, 2004). Para el procesamiento de imágenes se utilizó el software libre ImageJ.

4.4.3.1.EFECTO DIRECTO DE LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA (A/BA+A/BB) EN EL PLÁSMIDO pDEST26 (PLASMID NICKING ASSAY)

Se cultivaron las células K562 junto a 2 concentraciones de la mezcla de Mameas (43.5 y 435 μ M) durante 48 h. Como vehículo se utilizó el solvente DMSO (0.28%). Como control positivo se utilizó el reactivo de Fenton (30 μ M de H₂O₂, ácido ascórbico 50 nM y 80 nM de FeCl₃), así como la endonucleasa Eco RI (cat. 10703737001, Roche, Holding, Suiza)(Habib, Tabrez, & Ahmad, 2011) (Athar *et al.*, 2011). Se mezclaron, de manera separada 0.5 μ g de ADN del plásmido pDEST26 en un tubo de 200 μ L. Al cabo de 1 h se vertió a cada tubo 12 μ L de agua libre de DNasa/RNasa y se incubó durante a 37 °C. Posteriormente, se insertó el plásmido en un gel de poliacrilamida y se realizó una electroforesis a 80 V durante 2 h. Enseguida, el gel se tiñó con la solución gel red (0.5 μ g/L). El ADN se visualizó con un transiluminador de UV utilizando el software Biomaging (UVP) y se fotografió con el sistema Gel Doc (ultravioleta productos [UVP] Ltd, Cambridge, Reino Unido).

4.4.4.ENSAYOS DE MUERTE CELULAR Y APOPTOSIS

4.4.4.1.FRAGMENTACIÓN DE DNA (ENSAYO DE TUNEL)

La muerte celular fue evaluada mediante el ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) (fluoresceinTM, Roche GmbH Mannheim, Alemania), en células K562. Para ello se incubaron las células (K562) con la mezcla de Mameas (43.5 μ M) durante 48 h. Posteriormente, las células fueron fijadas con ácido acético a 20 °C, y después se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL durante 1 h a 37 °C. Las muestras fueron lavadas con PBS tres veces y se analizaron por microscopía de fluorescencia, usando un microscopio Nikon E600 con una cámara digital (Nikon, Melville, NY, E.U.).

4.4.4.2. INMUNOFLUORESCENCIA CASPASA-3 ACTIVA

Para confirmar si existe citotoxicidad por muerte celular tipo apoptosis se evaluó la actividad de la enzima Caspasa-3. Para ello, se incubaron en caja Petri las células K562 (5×10^5) durante 24 h con la mezcla de Mameas (43.5 μM), Taxol (25 nM) y DMSO (0.28%). Después, las células se sembraron en placas de caja Petri con cubreobjetos estériles, luego, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min (4 °C). Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con solución TBS (6.05 g de Tris, 8.76 g de NaCl, en 800 mL de agua destilada y ajustar a pH=7.6) con 0.1% de Tween. Enseguida, las células se permeabilizaron con una solución (0.1% Tritón X-100, 0.1% de Tween en solución TBS) durante 1 h, para después bloquear la reacción con albúmina de suero bovino (5%) durante 1 h. Las células se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 (forma activa) (1:250) (3015-100, BioVision, Milpitas, CA, E.U.) a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se incubó en la oscuridad durante 1 h con el anticuerpo secundario de conejo Alexa Fluor 546 anti-IgG (A11030; 1:500; Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.). Los cubreobjetos se montaron utilizando el medio de montaje 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras fueron observadas en un microscopio Nikon E600 con una cámara digital (Nikon, Melville, NY, E.U.). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los cubreobjetos sin anticuerpo primario se procesaron en paralelo como controles negativos. Como control positivo se utilizó Taxol (25 nM). Para procesar las imágenes se utilizó el software de libre acceso ImageJ.

4.4.5. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE CELULAS K562

Para ensayar los cambios ultraestructurales inducidas en células K562 tratadas con mezcla de Mameas a 43.5 μM , se utilizaron como control negativo DMSO 4% (v/v) y como control positivo rotenona (13 μM). Después de 12 h de tratamiento con la mezcla de Mameas, las células se fijaron con una solución de glutaraldehído (2,5% v/v), 1% de tetróxido de osmio y 0,8% ferrocianuro de potasio, y calcio 5 μM . Posteriormente las células se deshidrataron en acetona y se incluyeron en Epon Ultrathin™ fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión EII JEOL JEM 12000 en la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, Ciudad de México, México.

4.4.6. ANÁLISIS DE CONCENTRACION DE Ca^{2+} DE CELULAS K562

Las células de leucemia (K562) se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/cm² por pozo, con un cubreobjetos de 12 mm de diámetro y se cultivaron durante 24 h con medio DMEM suplementado. Las células fueron cargadas con 2.5 μM Fura 2-AM en bajo Ca^{2+} (0,1 mM) a temperatura ambiente ($\sim 21^\circ\text{C}$) y, se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 ; a continuación, se transfirió a una cámara de perfusión climatizada montado en un microscopio invertido Nikon Diaphot 200 (Nikon, Tokio, Japón). Las células adheridas al cubreobjetos fueron perfundidos continuamente a una velocidad de 2 a 2,5 ml/min con solución de Krebs a 37°C y se burbujeo continuamente con carbógeno para mantener un pH en 7,4. Las células cargadas con Fura 2-AM se sometieron a pulsos alternos de luz de excitación de 340-380 nm, y se detectó fluorescencia emitida a 510 nm utilizando un modelo D104 microphotometer de Photon Technology International (PTI, Princeton, NJ, EE.UU.). La fluorescencia se midió a una velocidad de 0,5 s, y se calculó según la fórmula Grynkiewicz ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). La K_d de Fura 2-AM se supone que es 386 nM. La media de 340-380-nm coeficientes de fluorescencia para R_{max} y R_{min} se obtuvieron mediante la exposición de las células a 10 mM Ca^{2+} en presencia de 10 mM ionomicina y Ca^{2+} libre de Krebs con EDTA 10 mM, respectivamente. R_{max} fue de 6.06 y 0.39 R_{min} . La relación de fluorescencia a la luz de excitación de 380 nm de Ca^{2+} medio exento de Ca^{2+} y células saturadas (β) fue 4,23. Los registros se almacenan en un microordenador y se analizaron usando software de adquisición de datos y análisis (Felix-1.21TM). Las células seleccionadas se estimularon con 43,5 μM de la mezcla de Mamea A/BA + A/BB, para determinar la respuesta de calcio de 15 min a 1 h. Las diferencias en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]$ de las células K562 fueron evaluados a través de la metodología de t-Student pareada o no pareada. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Los datos se expresaron en el texto y las ilustraciones como media \pm SEM.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresaron como media aritmética con desviación estándar. Para saber si es una prueba paramétrica se utilizó la prueba de Levene ($P < 0,05$). Posteriormente se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Todos los datos fueron procesados utilizando GraphPad PrismTM Software versión 5.00.28 (San Diego, CA, E. U., 2007).

5.RESULTADOS

5.1.AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COUMARINAS

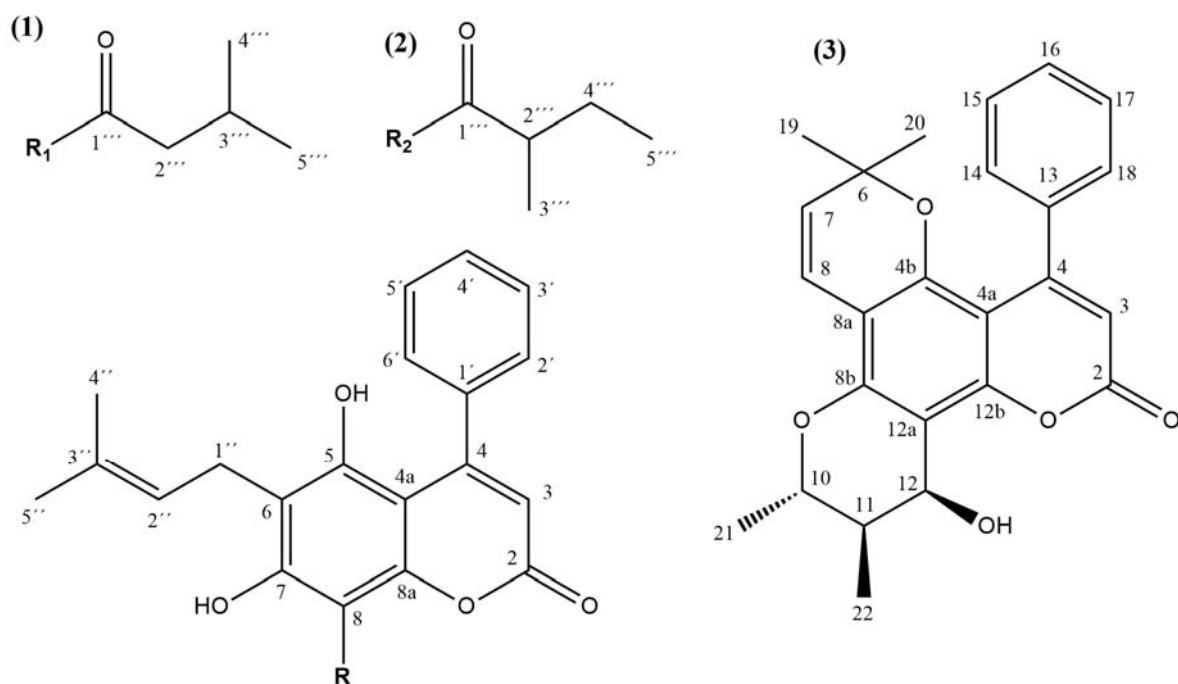


Figura 11. 1) Mammea A/BA-R1; 2) Mammea A/BB-R2; 3) Soulatrólido.

5.1.1 MAMMEA A/BA + A/BB (QT-1)

Las hojas de *Calophyllum brasiliense* fueron colectadas en el Estado de Veracruz, México en Enero de 2014. Los vouchers fueron identificados y depositados en el "Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM)" con los números 16131, 16132 y 16133. Los compuestos fueron aislados por cromatografía e identificados por las herramientas espectroscópicas mencionadas en la Metodología, los cuales fueron identificados como una mezcla de coumarinas tipo Mammea A/BA y A/BB en una proporción 3:1 mediante cromatografía de columna en fase normal y se identificaron mediante espectroscopia comparandolos con los reportes anteriores (Crombie *et al.*, 1966, Reyes-Chilpa *et al.*, 2004)(Tabla 4). El rendimiento de las coumarinas tipo Mammea se estimó en 1,5%.

Tabla 4. Datos de RMN de ^1H -y ^{13}C para la mezcla de coumarinas tipo Mamea A/BA+A/BB (3:1) aisladas de *C. brasiliense* (Figura 11).

Mamea A/BA+A/BB (3:1)				
Posición	Mamea A/BA		Mamea A/BB	
	$^1\text{H}^*$ (J, Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$	$^1\text{H}^*$ (J, Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$
C-2		158.6s		158.6s
C-3	5.99(s, 1H)	112.1d	5.99(s, 1H)	112.1d
C-4		154.2s		154.2s
C-4 a		100.5s		100.5s
C-5	5.94(s, 1H)	157.1s	5.94(s, 1H)	157.1s
C-6		112.6s		112.6s
C-7	14.6(s, 1H)	166.9s	14.6(s, 1H)	166.9s
C-8		104.3s		104.3s
C-8 a		155.7s		155.7s
C-1´		137s		137s
C-2´	7.42(m, 2H)	127.5d	7.42(m, 2H)	127.5d
C-3´		128d		128d
C-4´	7.56(m, 3H)	130.3d	7.56(m, 3H)	130.3d
C-5´	7.42(m, 2H)	129.5d	7.42(m, 2H)	129.5d
C-6´		127.5d		127.5d
C-1´´	3.3(d, J=6Hz, 2H)	21t	3.3(d, J=6Hz, 2H)	21t
C-2´´	5.10(t, J=6Hz, 1H)	120.8d	5.10(t, J=6Hz, 1H)	120.8d
C-3´´		134s		134s
C-4´´	1.7(s, 3H)	17.8q	1.7(s, 3H)	17.8q
C-5´´	1.65(s, 3H)	25.7q	1.65(s, 3H)	25.7q
C-1´´´		206.9s		210.5s
C-2´´´	3.19(d, J=9Hz, 2H)	53.6t	3.95(m, 1H)	47d
C-3´´´	2.32(m, 1H)	25.7d	1.02(t, J=7.5Hz, 3H)	16.6q
C-4´´´	1.06(d, J=6.6Hz, 3H)	22.7q	1.93(m, 1H) 1.50(m, 1H)	27.2t
C-5´´´	1.06(d, J=6.6Hz, 3H)	22.7q	1.29(d, J=6.6, 3H)	11.8q

*300MHz/CDCI3; **75.4MHz/CDCI3

5.1.2.SOULATRÓLIDO (QT-2)

Las hojas de *Calophyllum brasiliense* QT-2 fueron colectadas en el Estado de Veracruz, México en Enero de 2014. Los vouchers fueron identificados y depositados en el IMSSM con los números 16134 y 16135. El Soulatrólido fue aislado utilizando cromatografía en columna en fase normal e identificados por las herramientas espectroscópicas mencionadas en la Metodología y comparados con informes anteriores para Soulatrólido (Gunasekera *et al.*, 1977) (Tabla 5). El rendimiento de Soulatrólido Las cumarinas se estimó como 1% de las hojas de peso seco.

Tabla 5.Datos de RMN de ^1H -y ^{13}C para el Soulatrólido (Figura 11), aislado de *C. brasiliense*.

Soulatrólido		
Posición	$^1\text{H}^*$ (J, Hz)	$^{13}\text{C}^{**}$
C-2		160.5s
C-3	5.95(s, 1H)	111.7d
C-4		156.3s
C-4a		103.1s
C-4b		151.2s
C-6		77.2s
C-7	5.36(d, J=9.7 Hz, 1H)	127.2d
C-8	6.53(d, J=9.7 Hz, 1H)	115.9d
C-8a		106.1s
C-8b		153.7s
C-10	4.28(d, J=10.9,6.1Hz, 1H)	73d
C-11	1.77(ddq, J=10.9, 7.0, 3.3 Hz, 1H)	38.3d
C-12	5.03(d, J=3.3, 1H)	51.8d
OH-12	2.50(s, 1H)	
C-12a		106.1s
C-12b		153.6s
C-13		140s
C-14	7.36(m, 2H)	127.3d
C-15	7.23(m, 3H)	127.6d
C-16		127.6d

C-17		127.6d
C-18	7.36(m, 2H)	127.3d
C-19	0.93 (s,3H)	26.8q
C-20	0.93 (s, 3H)	26.9q
C-21	1.43(d, J=6.1Hz, 3H)	18.8q
C-22	1.16(d, J=7.0Hz, 3H)	12.5q

*300MHz/CDCl₃; **75.4MHz/CDCl₃

In silico

5.2.LAS COUMARINAS DE *C. BRASILIENSE* PRESENTAN POTENCIAL COMO POSIBLES "DRUG LEADS"

Los resultados correspondientes a los parámetros fisicoquímicos de las coumarinas aisladas de *Calophyllum brasiliense* (Mammea A/BA, A/BB, y Soulatrólido) obtenidas con los softwares de libre acceso Molinspiration Bioactive and Chemical Scores son resumidos en la Tabla 6 y 7. Mientras que los parámetros toxicológicos *in silico* para estos mismos compuestos obtenidos con Osiris Data Warrior se muestran en la Tabla 8.



Tabla 6. Parámetros de fisicoquímicos Mammea A/BA and A/BB y Soulatrólido. Lipofilicidad (miLogP), PSA (superficie de area polar Å), MW (Peso molecular), HBA (Aceptor de puentes de hidrogeno), HBD (Donador de puentes de hidrogeno), Nrotb (Numero de enlace rotables).

Molinspiration								
	miLogP	natoms	PSA	MW	nViolaciones	HBA	HBD	Nrotb
Mammea A/BA	2.88	30	88.9	408	0	5	3	6
Mammea A/BB	2.85	30	88.9	408	0	5	3	6
Soulatrólido	4.99	30	68.91	404	0	5	1	1

Tabla 7. Parámetros de bioactividad Mamea A/BA, A/BB y Soulatrólido. GPCR (Receptor Acoplado a proteína G).

Score de Bioactividad de Molinspiration						
	Ligando de proteína G	Modulador de canal Iónico	Inhibidor de cinasa	Ligando de receptor nuclear	Inhibidor de proteasa	Inhibidor Enzimatico
Mamea A/BA	-0.16	-0.22	-0.31	0.21	-0.18	0.36
Mamea A/BB	-0.15	-0.17	-0.32	0.28	-0.14	0.41
Soulatrólido	-0.07	-0.40	-0.22	0.33	-0.03	0.50

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de Mamea A/BA, A/BB y Soulatrólido, Osiris Data Warrior. MW (Peso Molecular), clogP (Lipofilicidad), logS (Solubilidad), DL ("Druglikeness"), DS (Drugscore). El riesgo toxicologico fue asignado de acuerdo al algoritmo utilizado por Osiris rojo (molecula de alto riesgo), amarillo (molecula de riesgo medio) y verde (molecula de poco riesgo) respectivamente.

Osiris			
Propiedades	A/BA	A/BB	Soulatrólido
MW	408	408	406
cLogP	2.35	2.78	4.62
logs	-5.31	-5.59	-5.33
DL	-3.09	-2.75	-3.05
DS	0.17	0.16	0.09
Mutagenico			
Tumorigenico			
Irritante			
Efectos Sobre el Sistema Reproductivo			

5.3.LAS COUMARINAS AISLADAS DE *C. BRASILIENSE* PRESENTAN UN PERFIL TOXICOLÓGICO Y TOXICOGENÓMICO SEGURO.

Los extractos hexánicos de partes aéreas de los especímenes correspondientes a QT-1 y QT-2, así como las coumarinas: Soulatrólido y Mamea (A/BA + A/BB 3:1) no produjeron ningún tipo de letalidad o daño en ninguna de las dosis evaluadas en el estudio (10 -2900 mg/Kg-Tabla 9), ni se observaron cambios en el comportamiento, ni cambios en la estructura y peso de los principales órganos, por lo cual estas sustancias caen en la categoría de ligeramente tóxicas ($DL_{50} > 3000$ mg/Kg) de acuerdo a la clasificación de Lorke (Lorke, 1983).

Tabla 9. Actividades toxicológicas *in vivo* (Ratones CD-1, p.o.).

Compuesto	DL_{50}
Extracto Hexánico QT-1	>5000mg/Kg
Mezcla de Coumarinas (A/BA+A/BB 3:1)	>5000mg/Kg
Extracto Hexánico QT-2	1000mg/Kg
Soulatrólido	3000mg/Kg

En la Tabla 10 se observan los análisis de calidad correspondientes a las extracciones de RNA efectuadas en hígado de los ratones tratados con las coumarinas, dichas extracciones fueron llevadas a cabo después de 1 semana de tratamiento como se menciona en la Metodología. En la segunda columna observamos el RIN (Numero de integridad de RNA) este es un valor basado en diferentes mediciones a las que es sometida la muestra de RNA al pasar por un gel mediante electroforesis capilar, en general valores mayores a 5 y homogéneos entre sí, son considerados buenos para correr microarreglos con RNA de cultivos celulares(Schroeder et al., 2006). Por lo que nuestra extracción fue considerada adecuada para utilizarla en microarreglos. En el caso de la última columna, muestra el valor de radio para las absorbancias de 260 nm vs 280 nm ($A_{260}/280$); este radio es utilizado para cuantificar el grado de contaminación por proteínas y otras moléculas orgánicas en una extracción, pues los grupos aromáticos en las proteínas y otras moléculas orgánicas absorben a 280 nm, en general para RNA un valor cercano a 2 es considerado adecuado.

Tabla 10. Análisis de calidad de RNA empleado en cada una de las muestras de los microarreglos.

Muestra (RNA)		RIN Score (Número de Integridad de RNA)	RNA (ng/mL)	Radio A260/280
Mammea (ABA+A/BB 3:1)	M1	7,1	68,99	1,85
	M2	7,7	81,93	1,85
	M3	7,2	81,62	1,95
Soulatrólido	S1	7,4	83,28	1,93
	S2	7,6	85,45	1,88
	S3	7,3	83,38	1,8
Control	C1	7,3	88,87	2
	C2	7,3	88,63	1,96
	C3	6,7	86,89	1,94

Una vez obtenidos los resultados se realizó un análisis de control de calidad estadístico de los datos provenientes de dichos microarreglos (Figura 12), mediante un análisis de componente principal (PCA-plot), esta técnica sirve para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos y presentar una proyección según la cual los datos queden mejor representados. En la Figura 12, podemos apreciar que los microarreglos se distribuyen en grupos de PCA homogéneos dependiendo del tipo de tratamiento que se trate (Rojo -tratamiento con Mammeas, Verde-tratamiento con Soulatrólido, y Azul-tratamiento control), lo anterior nos permitió seguir el análisis bioinformático (Metodología Experimental-4.3.2.1) y determinar el número de DEG's de cada tratamiento con respecto al control (Figura 13) en el cual encontramos que en el tratamiento con la mezcla de Mammeas (A/BA+A/BB-3:1) existían 46 genes *upregulated* y 72 *downregulated* a diferencia de los tratamientos con Soulatrólido en los cuales existían, 665 genes *upregulated* y 1077 *downregulated*. Dichos genes fueron procesados por un análisis de enriquecimiento en las diferentes bases de datos previamente mencionadas en la metodología (Metodología Experimental-4.3.2.2) en donde determinamos que la gran mayoría de estos genes estaba relacionada con el metabolismo de fármacos y moléculas orgánicas (Tabla 11).

Gráfica de PCA-Microarreglos

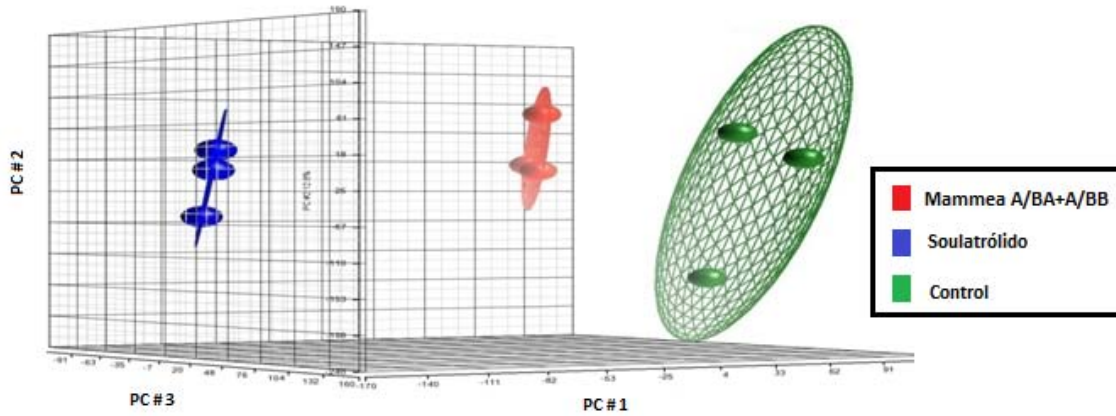


Figura 12. Análisis de PCA (principal component analysis) de los microarreglos. M = Mammae (A/BA+A/BB - 3:1); S= Soulatrólido y C= control SSL.

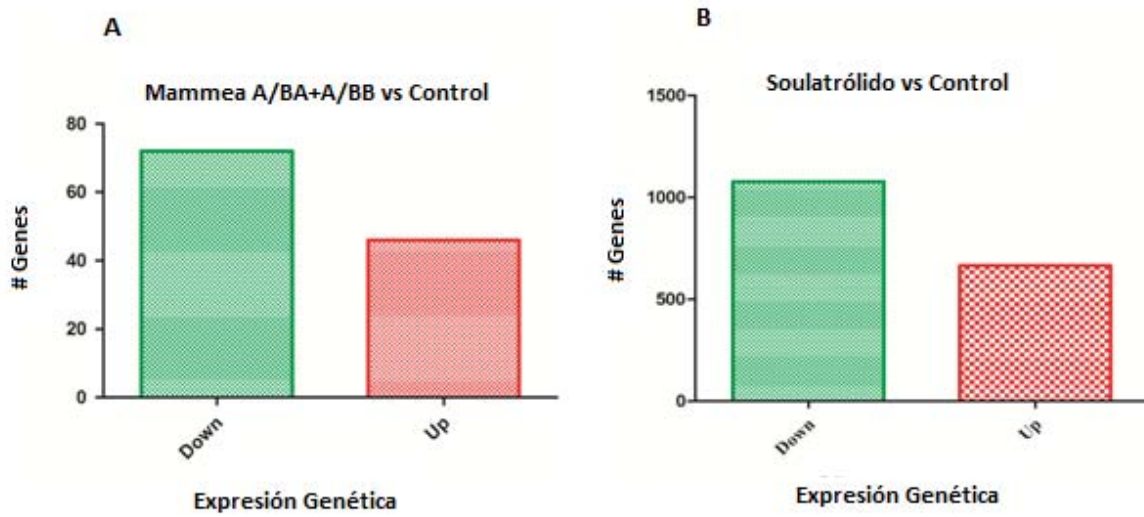


Figura 13. Genes diferencialmente expresados en cada tratamiento (Fold Change >1,5 y <-1,5; Valor -p <0,05). A) Mammae (A/BA+A/BB -3:1) -M vs Control 46 genes Up y 72 Downregulated. B) Soulatrólido-S vs Control genes 665 Up y Downregulated 1077.

Tabla 11. Cascadas de señalización enriquecidas de acuerdo a los resultados de los tratamientos con coumarinas en hígado de ratones tratados. (Soulatrólido: 1744 DEG's, Mammae A/BA+A/BB: 120 DEG's).

Tratamiento	Ruta	Cuenta ¹	%C ²	Valor-P	ES
Mammae A/BA+A/BB (3:1)	Metabolismo de Fármacos ^a	6	5	1.9E-4	4.57
	Metabolismo de xenobióticos por CYP P450 ^a	5	4.2	1.3E-3	4.57
	Interacción con receptors citocina- citocina ^a	6	5	3.1E-2	2.27
	Metabolismo del retinol ^a	6	5	1.2E-4	2.18
	Respuesta a quimicos ^b	27	22.5	4.2E-6	NA ³
	Respuesta celular a un estímulo químico ^b	23	19.2	1.13E-7	NA ³
Soulatrólido	Metabolismo de xenobióticos por CYP P450 ^a	25	1.6	9.8E-9	4.87
	Metabolismo del retinol ^a	21	1.3	7.7E-6	4.87
	Metabolismo del glutatión ^a	15	1	5.0E-4	3.88
	Procesos metabólicos ^b	770	50	5.05E-63	NA ³
	Procesos de metabolismo de compuestos orgánicos ^b	688	44.6	6.44E-54	NA ³

^aKEGG identificada con DAVID. ^bGO-BP identificada por CTD. ¹Numero de DEG's envueltos en la ruta. ²Porcentaje del total de genes anotados en la lista de DEG's. ³Enrichment Score (ES) de cada grupo medido a partir de la media geometrica y modificado por la prueba de Fisher asociada a los terminos de enriquecimiento pertenecientes a cada grupo de genes. ⁴No reportado por CTD.

5.3.1. ANÁLISIS DE REDES.

Una vez realizado el análisis bioinformático para obtener los DEG's, se realizó el análisis de comparación del interactoma o análisis de redes mencionado en la Metodología para determinar si los DEG's expresados en los tratamientos de coumarinas tenían relación con algunas de las redes comunes de toxicidad en hígado. La Tabla 12 muestra los resultados correspondientes a los tratamientos con las coumarinas. Podemos apreciar que para la mezcla de Mammae A/BA+A/BB se encuentra significancia estadística únicamente para los seeds de las redes de HCD; H-M; (*downregulated*) y para la red de I-T (*upregulated*), sin embargo, no se desarrolla la red ni para 1PPI o para 2PPI. En el caso del Soulatrólido, se encuentra significancia estadística únicamente los

seeds de la red HCD (*downregulated*), sin embargo, al igual que en el caso de las Mameas estas no se desarrollan para 1PPI o 2PPI. Por otra parte, en la Tabla 13 se muestran los resultados para los análisis de los interactomas de los controles positivos; paracetamol a las 8 h (APAP) (Williams et al., 2004) y CCl₄ a las 8 h (Campos et al., 2014) así como para el control negativo tratamiento con CCl₄ a los 16 días. En el caso de los controles positivos la gran mayoría de los niveles (Seeds, 1PPI y 2PPI) de las redes del interactoma, son significativos y están sobreexpresados a diferencia del control negativo en donde el patrón es muy semejante a los tratamientos con coumarinas, únicamente existe una red significativa, pero que se encuentra *downregulated*. En la figura 14 se muestra a manera de ejemplo una imagen de una red (interactoma) correspondiente al motivo de apoptosis del control positivo de tratamiento con paracetamol a las 8 h (Williams et al., 2004).

5.4. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Todos estos datos fueron validados mediante estudios de histología clásica por H-E y PAS (Figuras 15 y 16) en hígado, bazo y riñón, en donde no se observó ningún tipo de daño tisular en ningún tejido. Adicionalmente, en hígado se realizó el ensayo de TUNEL para observar si existía algún indicativo de fragmentación de DNA derivado de algún tipo de muerte celular, sin embargo los resultados fueron negativos para este ensayo (Figura 17).

Tabla 12. Análisis de redes (interactoma) de los motivos funcionales correspondientes al tratamiento con coumarinas. Apoptosis en Ratón (ApoM); Daño a DNA (DNAd); Genes de Referencia (HCD); Hepatotoxicidad en Ratón (H-M); Necrosis en Ratón (NeM); Estrés Oxidante (O-S); Immunotoxicidad (I-T). n= numero de genes en la red. *Significancia estadística en los motivos enriquecidos (*p<0.05, **p<0.01); genes *upregulated* (rojo) o *downregulated* (azul).

Tratamiento	Mammea A/BA+A/BB (3:1)									
	Motivos	n	Valor-p	Seed	n	Valor-p	1PPI	n	Valor-p	2PPI
ApoM		81			271			769		
DNAd		82			139	*	0.17	489		
HCD		69	**	-0.2	148			422		
H-M		101	**	-0.17	212			635		
NeM		79			198			713		
OS		77			132			300		
I-T		56	**	0.25	100			405		

Tratamiento	Soulatrólido									
	Motivos	n	Valor-p	Seed	n	Valor-p	1PPI	n	Valor-p	2PPI
ApoM	82				271			769		
DNAd	69				139			489		
HCD	101	*	-0.29		148			422		
H-M	79				212			635		
NeM	77				198			713		
OS	56				132			300		
I-T	81	*	-0.26		100	*	-0.2	405		

Tabla 13. Análisis de redes correspondiente a los motivos funcionales para los controles. Apoptosis en Ratón (ApoM); Daño a DNA (DNAd); Genes de Referencia (HCD-1); Hepatotoxicidad en Ratón (H-M); Necrosis en Ratón (NeM); Estrés Oxidante (O-S); Immunotoxicidad (I-T).n= numero de genes en la red. *Significancia estadística en los motivos enriquecidos (*p<0.05, **p<0.01); genes *upregulated* (rojo) o *downregulated* (azul).

Control Positivo	APAP									
	Motivos	n	Valor-p	Seed	n	Valor-p	1PPI	n	Valor-p	2PPI
ApoM	81	**	0.62		271	**	0.5	769	**	0.42
DNAd	82	**	0.7		139	**	0.6	489	**	0.4
HCD	69	**	0.91		148	**	0.86	422	**	0.75
H-M	101	**	0.79		212	**	0.72	635	**	0.56
NeM	79				198			713		
OS	77	**	0.84		132	**	0.75	300	**	0.64
I-T	56	*	0.62		100	*	0.55	405	*	0.39
Control Positivo	CCl ₄ -8h									
	Motivos	n	Valor-p	Seed	n	Valor-p	1PP	n	Valor-p	2PPI
ApoM	81				271	**	0.43	769	**	0.39
DNAd	82	*	0.44		139			489	**	0.36
HCD	69	**	0.75		148	**	0.63	422	**	0.48

H-M	101	**	0.51	212	**	0.44	635	**	0.38
NeM	79			198	**	0.42	713	**	0.38
OS	77	**	0.7	132	**	0.6	300	**	0.48
I-T	56			100			405		
Control Negativo	CCl₄-16d								
Motivos	n	Valor- p	Seed	n	Valor- p	1PPI	n	Valor- p	2PPI
ApoM	81			271			769		
DNAd	82			139			489		
HCD	69	*	0.36	148			422		
H-M	101	**	-0.38	212	**	-0.34	635	**	-0.3
NeM	79			198			713	*	-0.24
OS	77			132			300		
I-T	56			100			405		

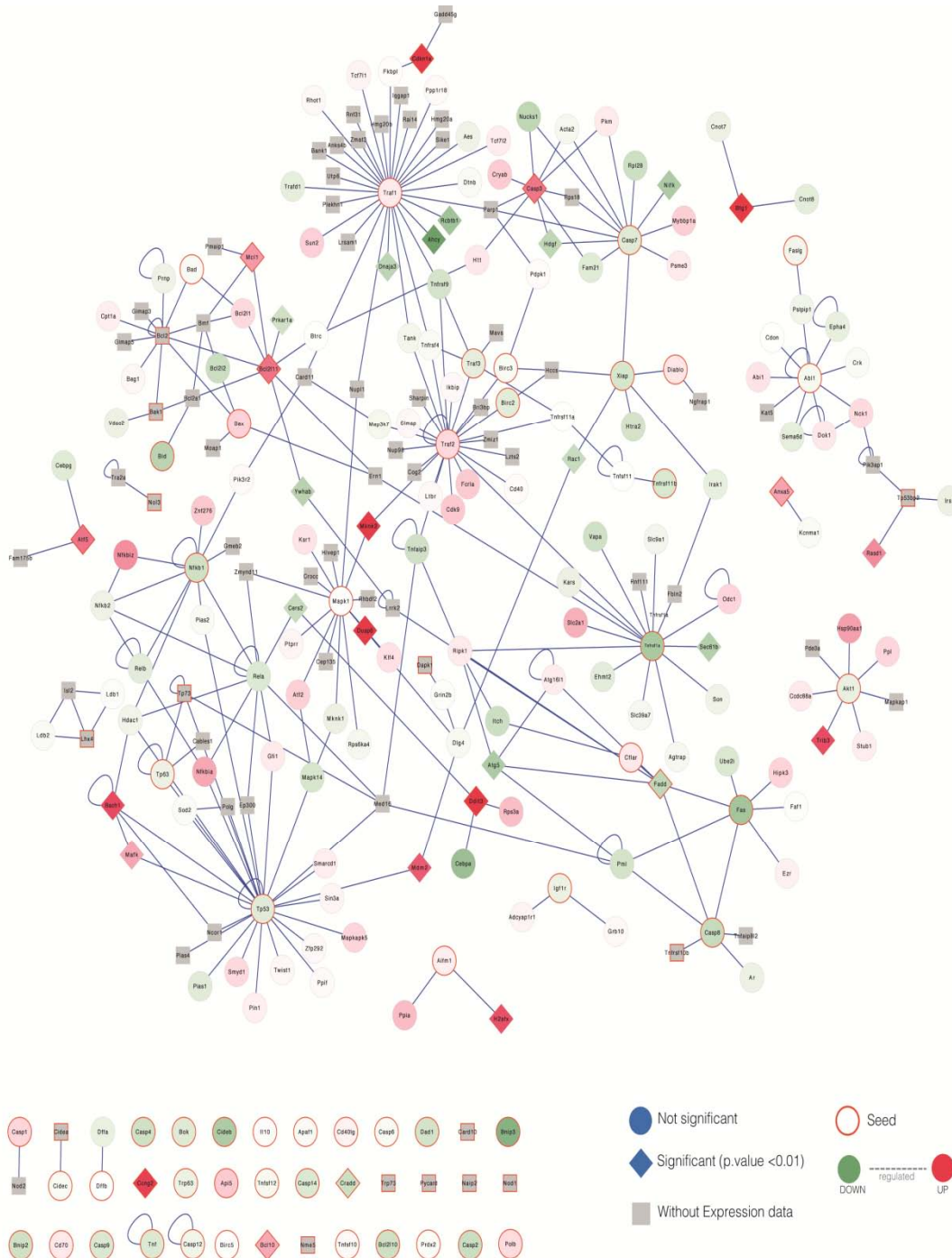


Figura 14. Ejemplo de la red del motivo de apoptosis construida por las interacciones físicas entre proteínas (Interactoma) y enriquecida con los datos del control positivo APAP (Williams et al., 2004). En rojo se ven los genes *upregulated*, verde genes *downregulated*, gris y cuadrado genes que no se encontraban en el microarreglo, rombo genes que son significativos, circular genes no significativos y contorno rojo genes *seeds*.

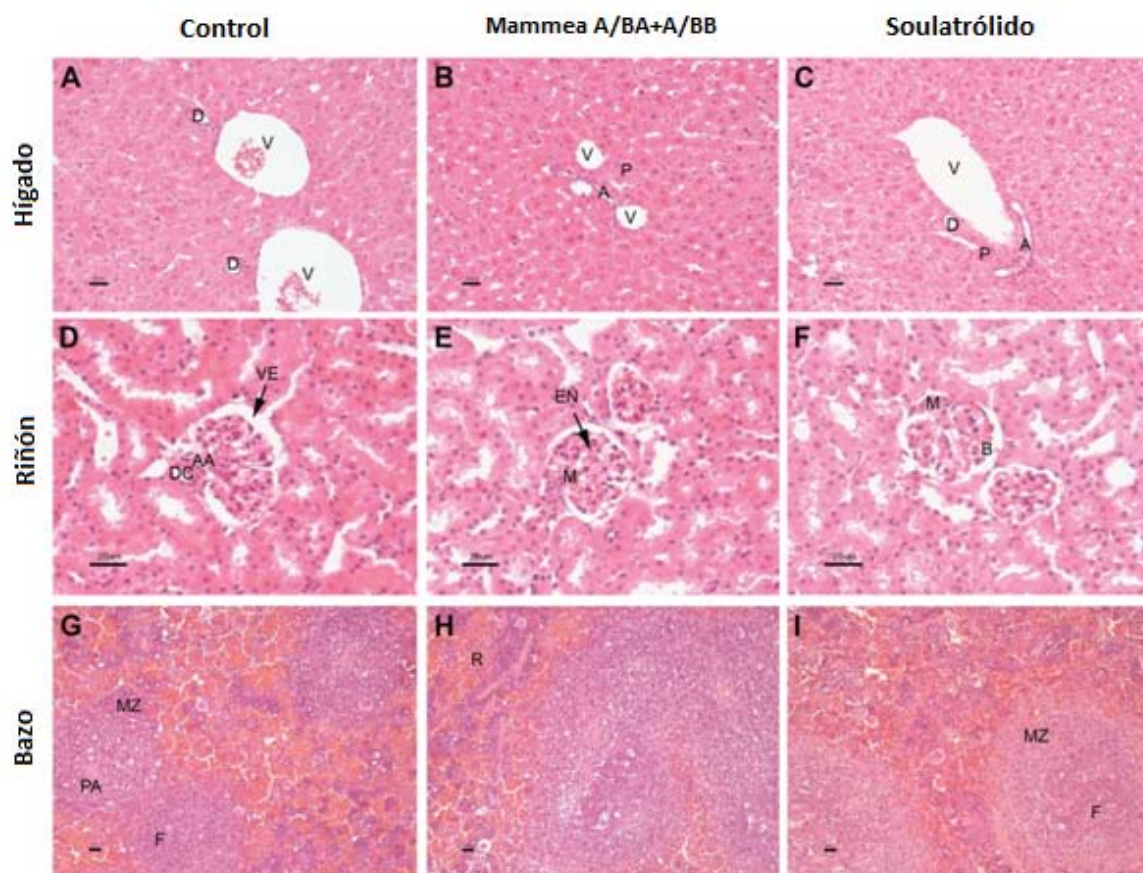


Figura 15. Histopatología Eosina-Hematoxilina de hígado, riñón y bazo de ratón tratado con Soulatrólido y Mammea A/BA + A/BB (100 mg/Kg/día-1 semana). Los ratones fueron tratados como se describe en la sección de Métodos y posteriormente el hígado (A, B y C), riñón (D, E y F) y bazo (G, H e I) se extrajeron para llevar a cabo la evaluación histopatológica. A, D, G: Control (SSI). B, E, H: Mammea A/BA + A/BB. C, F, I: Soulatrólido. Brevemente, el hígado: se conserva sin cambios en las ramas de la vena porta (V), la arteria hepática (A) o de las vías biliares (D). La presencia de áreas cerca de la vena porta (P) junto con las vénulas centrales (CV) y las células del hígado dispuestas en placas no se alteraron en los tratamientos. La morfología del riñón se evaluó mediante el análisis de las características glomerulares y no se observaron cambios; en particular, la celularidad global se conserva, y la simetría y el espesor de la pared capilar, las células epiteliales, las células endoteliales (ES) y células mesangiales (M) tenía características citológicas normales. Los podocitos que forman la superficie epitelial visceral (VE), el espacio de Bowman (B), las células periepiteliales (PE), los túbulos (T) y la membrana basal no se alteraron. En general la arquitectura del bazo, se conserva tanto para pulpa roja (R) como para pulpa blanca (W). La pulpa blanca se subdividió en la vaina linfóide periarteriolar (PA), los folículos (F) y la zona marginal (MZ), como se esperaba.

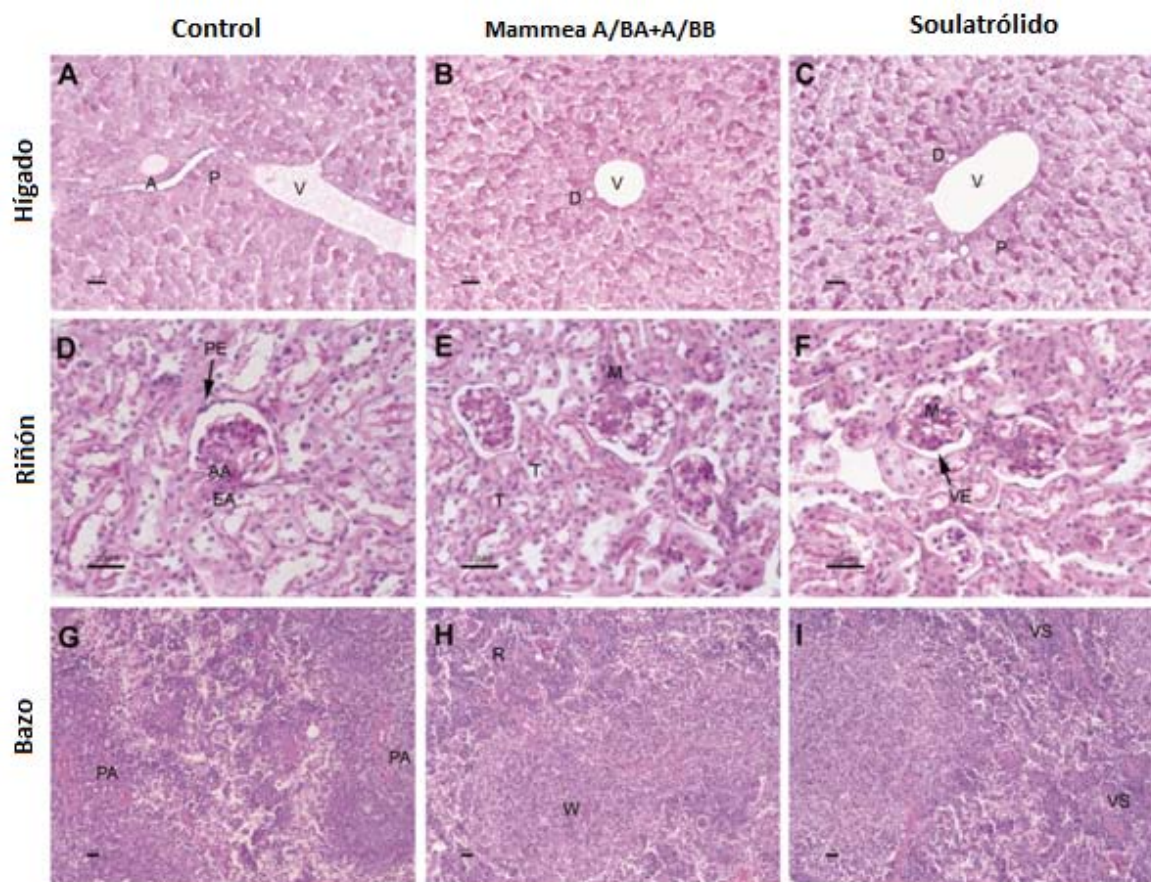


Figura 16. Histopatología de la tinción de PAS de hígado, riñón y bazo de ratón tratado con Soulatrólido y Mammea A/BA + A/BB (100 mg/Kg/día-1 semana). Los ratones fueron tratados como se describe en la sección de Métodos y posteriormente el hígado (A, B y C), riñón (D, E y F) y bazo (G, H e I) se extrajeron para llevar a cabo la evaluación histopatológica. A, D, G: Control (SSI). B, E, H: Mammea A/BA + A/BB. C, F, I: Soulatrólido. Brevemente, el hígado: se conserva sin cambios en las ramas de la vena porta (V), la arteria hepática (A) o de los ductos biliares (D). La presencia de áreas cerca de la vena porta (P) junto con las vénulas centrales (CV) y las células del hígado dispuestas en placas no se alteraron en los tratamientos. La morfología del riñón se evaluó mediante el análisis de las características glomerulares y no se observaron cambios; en particular, la celularidad global se conserva, y la simetría y el espesor de la pared capilar, las células epiteliales, las células endoteliales (ES) y células mesenquiales (M) tenía características citológicas normales. Los podocitos que forman la superficie epitelial visceral (VE), el espacio de Bowman (B), las células periepiteliales (PE), los túbulos (T) y la membrana basal no se alteraron. En general la arquitectura del bazo, se conserva tanto para pulpa roja (R) como para pulpa blanca (W). La pulpa blanca se subdividió en la vaina linfóide periarteriolar (PA), los folículos (F) y la zona marginal (MZ), como se esperaba.

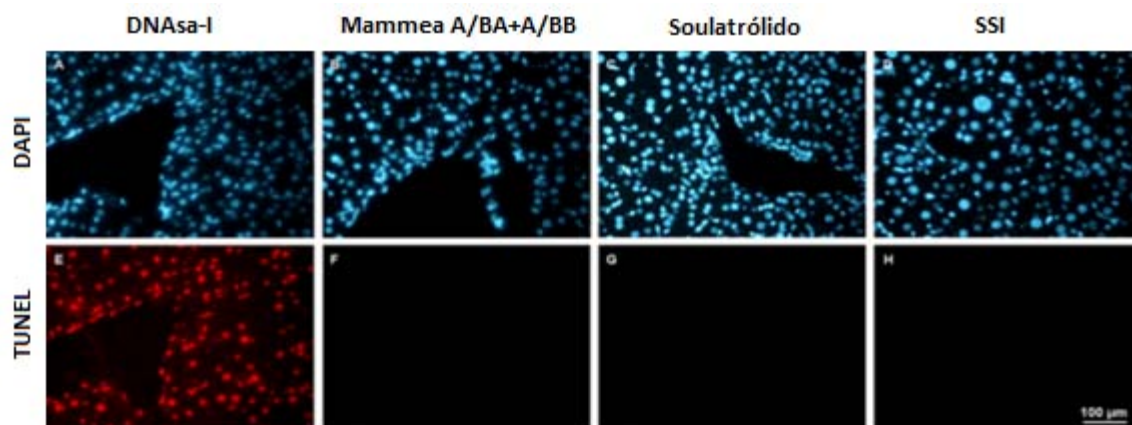


Figura 17. Ensayo de TUNEL correspondiente a tejido de hígado de ratones tratados con Soulatrólido y Mammea A/BA + A/BB. Tinción DAPI: A-D, TUNEL: E-H. Control Positivo (DNAsa I)(A,E), Mammea A/BA + A/BB (B,F), el tratamiento Soulatrólido (C, G) y el Control Negativo (D, H). Imágenes representativas de 3 repeticiones de cuatro animales diferentes.

IN VITRO

5.5. LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB INDUCEN MUERTE CELULAR TIPO APOPTOSIS EN LAS CELULAS K562

5.5.1. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE MAMMEA A/BA+A/BB SOBRE LA LÍNEA CELULAR K562

La mezcla de las coumarinas Mammea A/BA+A/BB (3:1), así como el extracto hexánico de hojas del *C. brasiliense* del cual fueron aisladas, presentaron actividad citotóxica contra la línea celular de leucemia humana (K562) a 50 µg/mL, (%I= 90 and 70.4% respectivamente). Además la IC₅₀ de la mezcla de las coumarinas antes mencionada fue determinada mediante la metodología de MTT como 43.5±6 µM, para una n=6 experimentos independientes y con 3 repeticiones cada uno.

Tabla 14. Evaluación de la actividad citotóxica de la Mammea A/BA+A/BB sobre la línea celular K562 mediante el ensayo de MTT (González-Sánchez et al., 2011). n = 6 experimentos independientes con 6 repeticiones

Placa	IC ₅₀ (µM)	R ² .
Placa 1-	40.7	r ² = 0.99
Placa 2	43	r ² = 0.92
Placa 3	38	r ² = 0.989

Placa 4	52	$r^2 = 0.988$
Placa-5	48	$r^2 = 0.90$
Placa 6	38	$r^2 = 0.97$
Promedio	43.5	

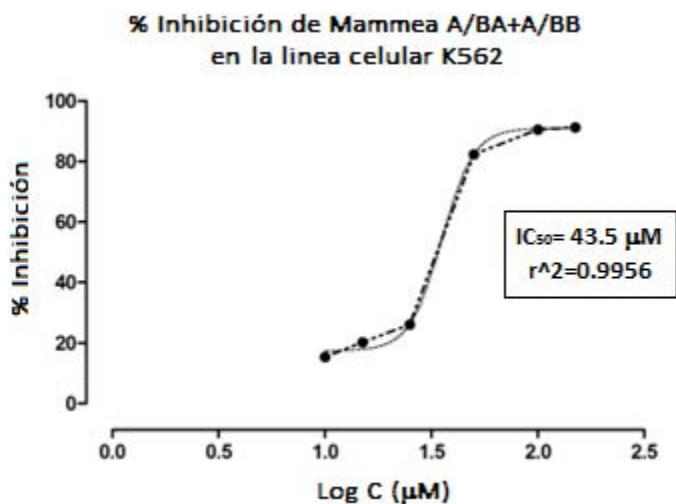


Figura 18. Citotoxicidad de la mezcla de Mamea A/BA+A/BB (3:1) en K562. Se determinaron 6 experimentos independientes con 6 réplicas cada uno para determinar un IC₅₀ de 43.5±6 μM. Como control se utilizó Taxol.

5.5.2. ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE MAMMEA A/BA+A/BB SOBRE LA LÍNEA CELULAR K562

Los resultados del ensayo cometa para determinar la genotoxicidad (1, 3 y 12 h) de la mezcla de coumarinas en la línea K562 se observa en la Figura 19, como control negativo se utilizó vehículo (DMSO) y como control positivo peróxido (H₂O₂). Los resultados se muestran como %TailDNA para cada tratamiento. Se puede apreciar un patrón de incremento de daño a DNA con respecto al tiempo, a partir de la 1 h de tratamiento, aunque en ninguna hora, es mayor con respecto al control positivo (H₂O₂-15 min), se puede apreciar un mecanismo de acción que provoca daño genotóxico desde la primer hora y el cual incrementa casi el doble entre la 1-3 h de tratamiento y después se mantiene con incremento constante, por este motivo se decidió hacer los microarreglos a la 3 h de tratamiento.

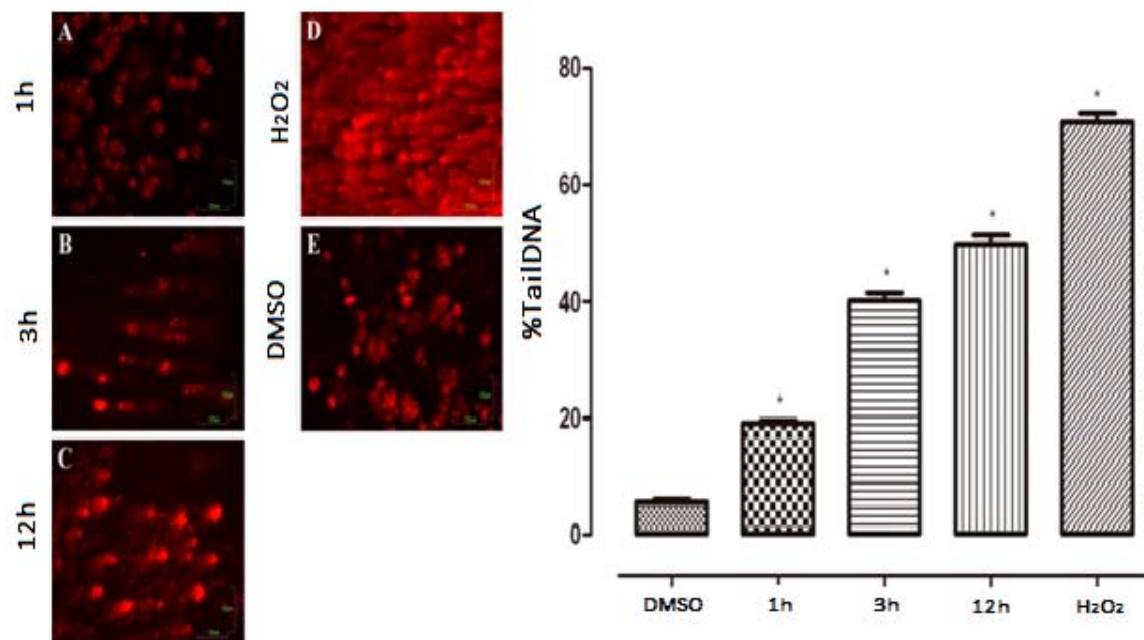


Figura 19. Ensayo de genotoxicidad (Prueba Cometa) de Mammea A/BA+A/BB en células K562. % TailDNA = 100 - Head%DNA. Prueba cometa a las 1 h (A), 3 h (B) y 12 h (C) de tratamiento de la mezcla de coumarinas Mammea A/BA and A/BB (3:1) a una concentración de 43.5 μ M. Control negativo (E) vehículo (DMSO-20 μ L). Control positivo (D) H₂O₂ (10%, 15 min). Imágenes representativas de 3 repeticiones de 3 experimentos independientes.

5.5.3. PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULAS K562 A LAS 3 H DE TRATAMIENTO CON LA MEZCLA DE COUMARINAS.

Como previamente se describió, se extrajo RNA de las células en tratamiento a las 3 h. Como resultado del análisis de clustering bioinformático (Metodología Experimental-4.4.1.2) correspondiente al perfil transcriptómico de las células K562, dentro de los principales clusters de DEG's (Figura 20) se encontró uno con genes relacionados principalmente con la ruta de muerte celular por apoptosis mediante la vía intrínseca.

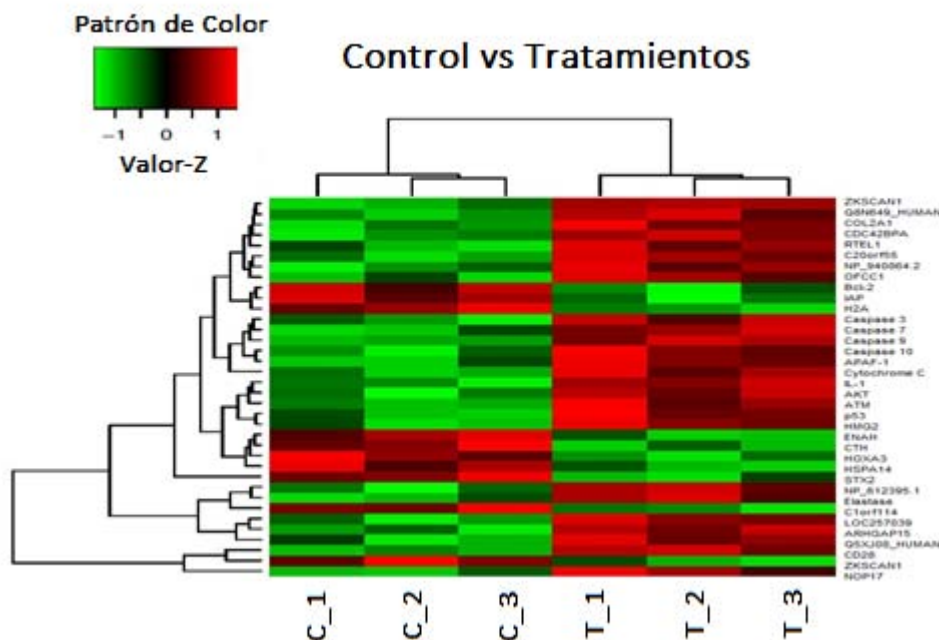


Figura 20. Perfil de expresión transcriptómica de células K562 tratadas con Mamea A/BA+A/BB (3:1) a una concentración de 43.5 μM . Analisis de clustering jerarquico, de 50 DEG's (Selecccionados por su valor-Z) de controles (C_1, C_2, C_3) vs tratamientos (T_1, T_2, T_3). El color indica el valor-Z normalizado verde (0 a -1 correspondiente a genes *downregulated*) y rojo (0 a 1 correspondiente a genes *upregulated*). De lado derecho los simbolos correspondientes a los nombres de los genes.

5.5.4.LAS COUMARINAS (A/BA+A/BB) INDUCEN UN PATRON DE FRAGMENTACIÓN DE DNA CARACTERÍSTICO DE APOPTOSIS.

La figura 21 muestra los resultados para el ensayo de TUNEL. En los cuales se puede apreciar un patrón de fragmentación de DNA en células K562 muy caracteristico de apoptosis después de 24 h de tratamiento con la mezcla de coumarinas a 43.5 μM (Figura 21B), en comparación con el vehículo (DMSO, Figura 21A), y muy parecido al del control positivo (0.25 μM de taxol, Figura 21C) que es bastante característica de este tipo de muerte celular.

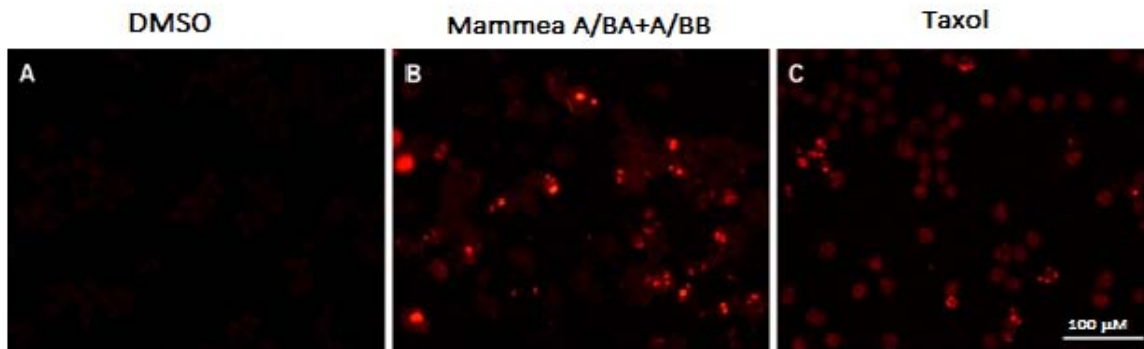


Figura 21. Patrón de fragmentación de DNA inducido por el tratamiento con la mezcla de Mammea A/BA+A/BB después de 24 h de tratamiento. A) Vehículo (DMSO). B) Mammea A/BA + A/BB (3:1)-43.5 μ M. C) Taxol-10 nM. Imágenes representativas de 3 repeticiones de 2 experimentos independientes.

5.5.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE CASPASA-3 EN CÉLULAS K562 TRATADAS CON LA MEZCLA DE LAS COUMARINAS.

Para confirmar el mecanismo de muerte celular por apoptosis, se llevó a cabo la inmunocitoquímica para evaluar la presencia de la conformación activa de una proteína (Caspasa-3) en las células K562 de las cuales se había observado el transcrito sobreexpresado en el análisis de expresión mediante microarreglos. En la figura 22 se observan los resultados correspondientes a la inmunocitoquímica de Caspasa-3 activa para células tratadas después de 18 h con: DMSO (Figura 22A-C), mezcla de coumarinas a 43.5 μ M (Figura 22D-F) y Taxol a 0.25 nM (Figura 22G-I). En esta figura se puede ver que la Caspasa 3 se encontraba activa en la mayoría de las células tratadas con coumarinas en comparación con vehículo, en el caso de las células expuestas a Taxol se observan menos cantidad de células con Caspasa 3 derivado de que el tipo de mecanismo de acción requiere más tiempo para efectuar la inducción de apoptosis (>24 h).

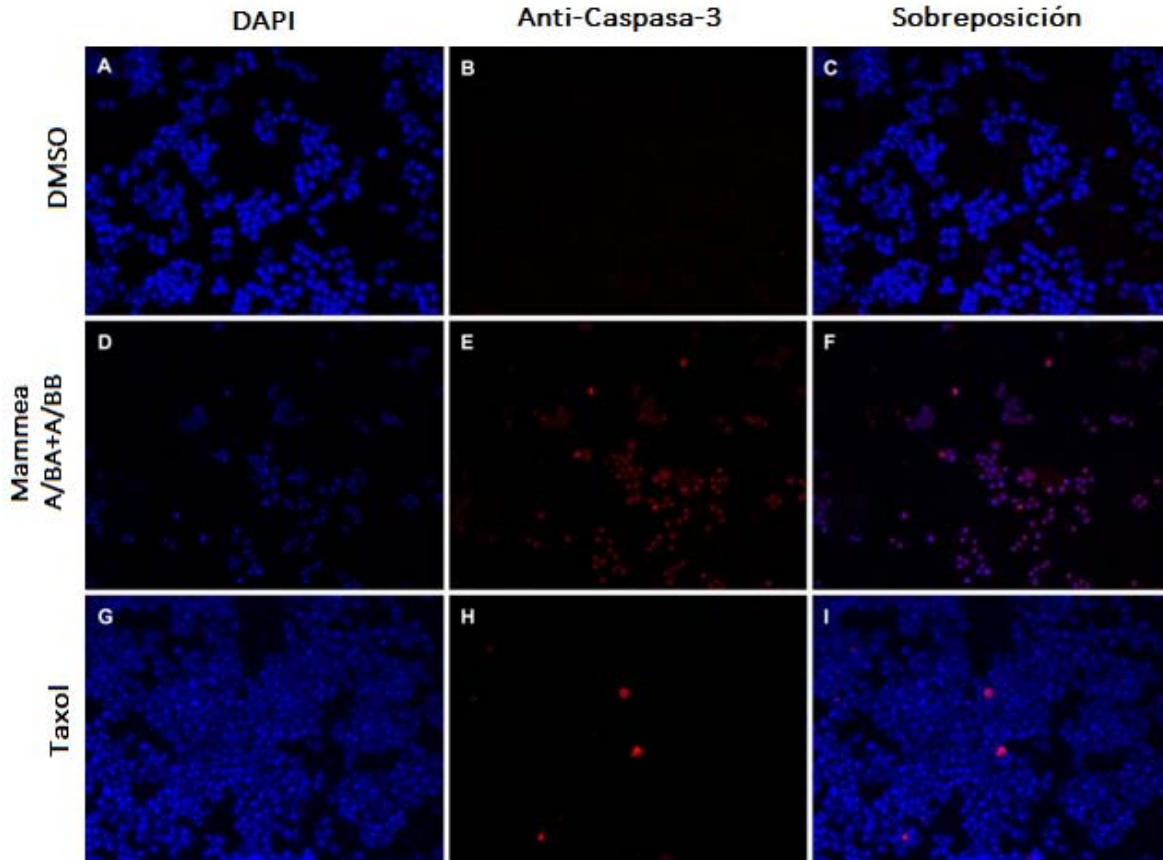


Figura 22. Actividad de Caspasa-3 inducida en células K562 tratadas. DMSO: A) DAPI, B) Anti-Caspasa 3 Activa, C) Sobreposición. Mezcla de Coumarinas: D) DAPI, E) Anti-Caspasa 3 Activa, F) Sobreposición. Taxol: G) DAPI, H) Anti-Caspasa-3 Activa, I) Sobreposición. Imágenes representativas de 3 repeticiones de 3 experimentos independientes.

5.6. LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB NO INTERACCIONAN DIRECTAMENTE CON EL DNA.

Para poder profundizar en el mecanismo de acción de las coumarinas decidimos analizar si estas tenían interacción química con el DNA, por lo cual realizamos el ensayo de interacción con plásmido (plasmid nicking assay) (Habib et al., 2011) con el plásmido pDEST25 a las concentraciones de 43.5 μM and 435 μM , este ensayo permite determinar si los compuestos inducen algún tipo de interacción fisicoquímica sobre la estructura química del DNA ya sea escindiéndolo, mellándolo o intercalándolo. En la Figura 23, se puede apreciar que en ninguno de los tratamientos con las coumarinas en estudio a 43,5 μM (A) o 430 μM (B) indujeron cambios en la topología clásica de los plásmido (Círculo Abierto y Superenrollado) y su patrón es muy similar al

del vehículo-DMSO (D), contrario al tratamiento con Enzima Eco-R1 que induce un cambio y lineariza la estructura del plasmido (C).

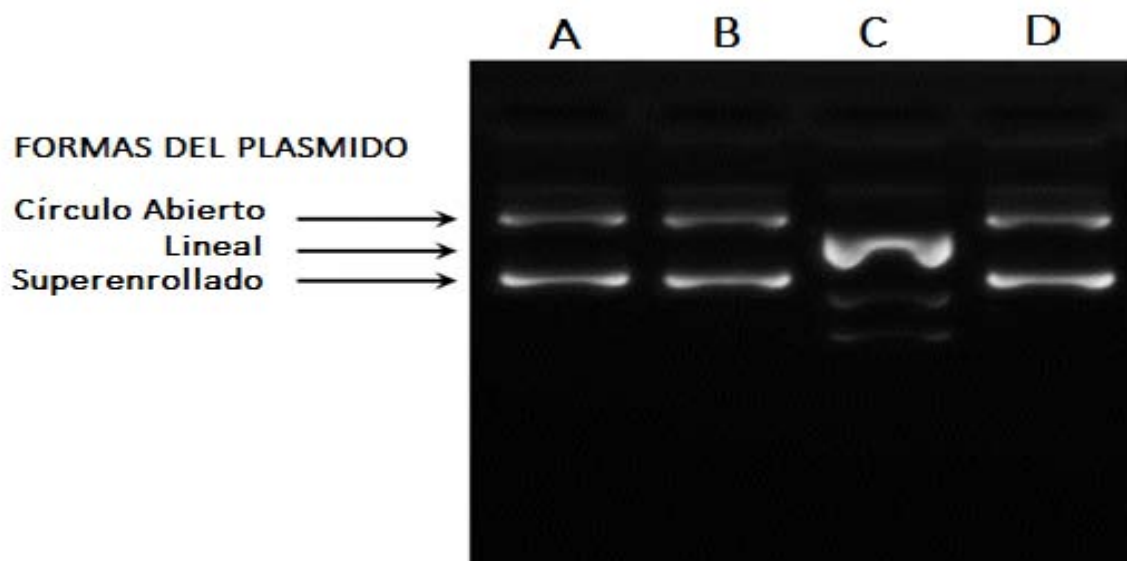


Figura 23. Ensayo de interacción de DNA con Mammea A/BA+A/BB. Tratamientos con: A) 43.5 μ M B) 430 μ M C) Enzima Eco R1 D) Vehículo (DMSO 10 μ L). Imágen representativa de 3 experimentos independientes.

5.7.LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB INDUCEN ALTERACIÓN EN LA ULTRAESTRUCTURA MITOCONDRIAL.

Dado que no existió interacción directa con el DNA, pero la ruta de apoptosis por vía mitocondrial (intrínseca) se encontraba sobre expresada, exploramos la posibilidad de que las Mammeas alteraran directamente la ultraestructura mitocondrial lo cual podría llevar a la probable liberación de citocromo C y por ende a la activación de toda la ruta apoptótica, por lo que analizamos mediante microscopia electrónica (Metodología Experimental-4.4.5) la ultraestructura mitocondrial de las células K562 a las 6h de tratamiento con la mezcla de las coumarinas a 43.5 μ M. En la Figura 24 se puede observar los resultados de los análisis de microscopia electrónica para cada uno de los tratamientos: Control negativo (Vehículo-DMSO), tratamiento con mezcla de las coumarinas (43.5 μ M), y como Control positivo utilizamos a Rotenona, que es un isoflavonoide que interacciona con el complejo I de la respiración y es conocido que daña la ultra estructura mitocondrial. En la Figura 24 se puede apreciar que en el caso de los tratamientos con la mezcla de las coumarinas afectaron la ultraestructura mitocondrial de las células K562 pues provocaron un aparente hinchamiento y pérdida de la turgencia, así como una alteración en la estructura de las

cresta mitocondriales, y la aparición de lisosomas propios de células en condiciones de estrés. Cabe destacar que si bien no fue tan evidente el daño como en el caso de la rotenona, esto puede deberse a la diferencia en el mecanismo de acción.

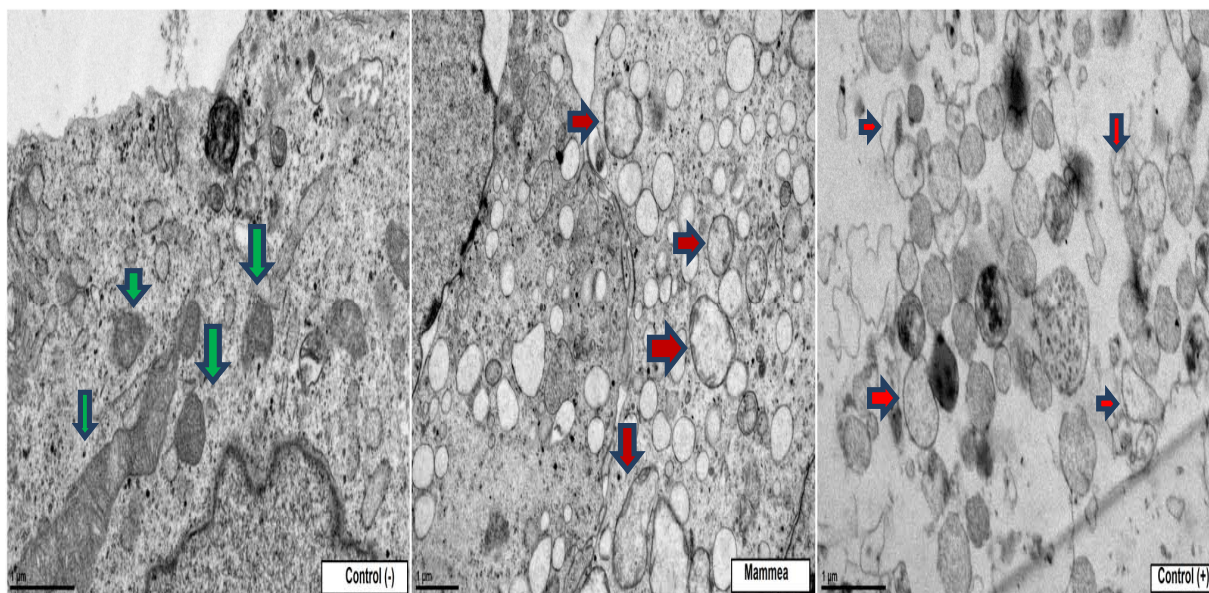


Figura 24. Las coumarinas inducen cambios morfológicos en la ultraestructura mitocondrial de las células K562. MET para Control (-) DMSO (A); Mammea A/BA+A/BB - 43.5 μM (B); Control (+) Rotenona-20 μM (C). Flechas señalan a las mitocondrias en el citoplasma celular, (Verde corresponde a mitocondrias normales) y (Rojo corresponde a mitocondrias alteradas). Aumento 2000 X. Imágenes representativas de 3 repeticiones de 2 experimentos independientes.

5.8.LAS COUMARINAS TIPO MAMMEA A/BA+A/BB INDUCEN UN INCREMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$

Uno de los principales marcadores de daño mitocondrial es la estimulación de las concentraciones de calcio $[Ca^{2+}]_i$, lo cual puede llevar a muerte celular a través de la cascada de señalización de apoptosis por vía intrínseca. Por este motivo, realizamos la determinación de la concentración de calcio $[Ca^{2+}]_i$ con Fura-2 (un agente marcador) en células tratadas con las coumarinas, el resultado se puede ver en la Figura 25, en la cual existe un incremento desde los 3 min de tratamiento con la mezcla de las coumarinas a 43.5 μM.

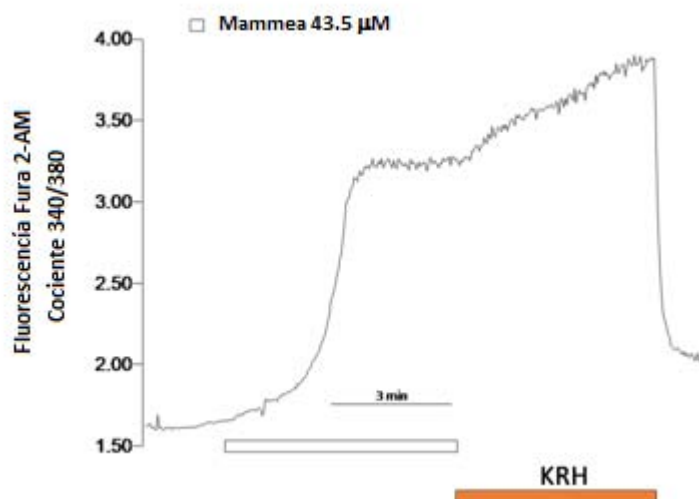


Figura 25. Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ en células K562 tratadas con mezcla de Mammeas. En la gráfica se puede apreciar un incremento en $[Ca^{2+}]_i$ después de los 3 minutos de tratamiento, después de los cuales se lava con solución de Krebs Ringer Henseleit (KRH) y existe otra corriente de $[Ca^{2+}]_i$, después de lo cual la corriente de calcio vuelve a su estado basal. Gráfica resultante del promedio de 3 experimentos independientes para 6 células individuales cada uno.

6.DISCUSIÓN

Aunque existe un aumento en el desarrollo de nuevas moléculas con propiedades terapéuticas prometedoras, la toxicidad sigue siendo de las principales razones por la cuales estas moléculas son retiradas de la clínica. En particular, la hepatotoxicidad es uno de los efectos adversos más comunes inducidos por las moléculas activas nuevas (Chen et al., 2014). Por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas (*in vivo* e *in silico*) haciendo énfasis en el potencial hepatotóxico. Para ello se realizó un estudio toxicogénico de exposición a corto plazo (Currie, 2012; Fielden et al., 2007; Römer et al., 2014) inducido por el Soulatrólido y la mezcla de Mammea A/BA+A/BB, aisladas de *C. brasiliense*. Estos compuestos representan potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos, contra: la enzima RT de VIH-1 y *M. tuberculosis* en el caso del Soulatrólido y para el tratamiento de la leucemia e infecciones parasitarias de *T. cruzi* y *L. amazonensis* en el caso de Mammea A/BA y A/BB (Abe et al., 2005; Brenzan et al., 2008; Juan C Gomez-Verjan et al., 2014; Huerta-Reyes et al., 2004b; Ito et al., 2006; Pires et al., 2014). Adicionalmente, profundizamos en el mecanismo de acción molecular de las Mammeas A/BA+A/BB sobre la línea celular K562 para determinar sus posibles blancos en esta línea celular.

In silico

Considerando que muchas moléculas activas no llegan a la fases clínicas, debido principalmente a sus propiedades ADME-Tox, se realizó un análisis quimiinformático (Tabla 6, 7 y 8) de las coumarinas empleadas en este estudio. En todos los casos, encontramos características fisicoquímicas y bioinformáticas similares para todas las coumarinas. Ninguna viola la "regla de 5" de Lipinski (Tabla 6), en el caso de la permeabilidad (LogP) todas son inferiores a cinco, lo que sugiere que estos compuestos presentarán un buen perfil de permeabilidad a través de las membranas celulares, lo cual es necesario para la actividad biológica y por lo cual, es muy probable que estos compuestos se unan fácilmente a su receptor. En el caso de PSA todas las coumarinas están por debajo de 160 Å, lo que implica que estas moléculas tendrán una mayor absorción en el cuerpo. Finalmente, el número de enlaces rotables fue menor para todas las coumarinas, por lo cual estos compuestos presentarán un rendimiento óptimo en el proceso de síntesis química y escalamiento, e inclusive en el caso del Soulatrólido, este representa la mejor molécula a desarrollarse. Por otro lado, una molécula orgánica se considera activa, si su valor de bioactividad en las diferentes enzimas es mayor a cero, en el presente estudio todas las coumarinas presentaron valores positivos como inhibidores enzimáticos, y como ligandos de receptores nucleares (Tabla 7), esto representa potencial para buscar actividades de estos sobre enfermedades que involucren dichos blancos terapéuticos.

Por otro lado, las Mameas A/BA y A/BB mostraron ser fármacos aparentemente seguros, sin efectos tumorigénicos, mutagénicos o irritantes, como se evaluó en Osiris Data Warrior, a diferencia del Soulatrólido el cual aparentemente presenta actividad como irritante y efectos sobre el sistema reproductivo, sin embargo, el algoritmo de Osiris es teórico y utiliza similitudes basadas en estructura química, pues al analizar el valor de drugscore de este compuesto no es tan bajo (0.9) en contraste con las Mameas (0.17-0.16), este valor es apoyado por datos toxicológicos *in vivo* (Ruiz-Marcial et al., 2007). Sin embargo, estos datos sugieren que dichas coumarinas deben de ser evaluadas experimentalmente sobre la reproducción. Por otro lado, en su conjunto las coumarinas presentaron valores de druglikeness (DL) estimados en el rango de -3.09 y -2.79; cabe destacar que se espera que una molécula con potencial de ser un fármaco presente valores de DL positivos, indicando que posee dentro de su molécula fragmentos estructurales que comúnmente se encuentran en los fármacos comerciales. Sin embargo, este parámetro es bastante controversial pues un valor positivo de DL no significa necesariamente que

estos fragmentos estén equilibradas con otras propiedades. Por ejemplo, una molécula puede tener partes de tipo fármaco, pero sólo con fragmentos lipófilicos; y esta molécula tendría una puntuación alta de druglikeness, aunque no sería realmente útil para ser formulada debido a su alta lipofilia (Molinspiration). En este sentido las coumarinas, muestran que en su conjunto analizando todas sus propiedades fisicoquímicas y bioinformáticas poseen fuerte potencial para ser tomadas en cuenta como moléculas líderes en el desarrollo de nuevos fármacos contra diferentes tratamientos entre los que destacan leucemia (Mammea A/BA y A/BB) la tuberculosis y el VIH (Soulatrólido).

In vivo

Como resultados en el ensayo de Lorke, que es el primer ensayo para probar toxicidad *in vivo*, reveló que los compuestos Soulatrólido y la mezcla de Mammeas A/BA+A/BB, así como los extractos hexánicos de donde estos compuestos fueron aislados, caen en la categoría de toxicidad moderada o baja, ya que son necesarias dosis muy elevadas de estos compuestos para poder inducir muerte en ratones ($DL_{50} > 3000$ mg/Kg) y en ningún caso se observó cambios morfológicos en algunos de los órganos blanco (Hígado, Bazo, Riñón, Corazón y Testículo). Estos resultados ponen de manifiesto el perfil de seguridad de ambos tipos de coumarinas cuando son administrados de forma aguda.

Por otro lado, adicionalmente a los análisis de toxicología clásica, en los últimos años la toxicogenómica se han convertido en una herramienta de última generación para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Khan et al., 2014). De hecho, se ha demostrado que existen perfiles de expresión específicos en diversos tejidos de organismos modelo, que son expuestos a determinados compuestos químicos y que se encuentran asociados con los mecanismos de acción toxicológica de dichos compuestos. Por lo tanto, se ha sugerido que los perfiles transcriptómicos, se pueden utilizar para predecir la toxicidad asociada a un fármaco o nueva molécula (Gusenleitner et al., 2014). Inclusive varios estudios en los últimos años, destacan la importancia del perfil de transcripción de hígado, como una valiosa herramienta para la predicción toxicológica en el desarrollo farmacéutico (Fielden et al., 2007; Gusenleitner et al., 2014; Nie et al., 2006; Waters, Jackson, & Lea, 2010). En consecuencia, en el presente estudio hemos aplicado un análisis basado en la expresión génica de hígado mediante un estudio de exposición a corto plazo (Currie, 2012; Fielden et al., 2007; Römer et al., 2014) en ratones de la

cepa CD-1, para identificar el perfil transcriptómico inducido por el tratamiento con las coumarinas antes mencionadas, con el fin de tener resultados predictivos de toxicidad (Fielden et al., 2007).

Como resultados del estudio toxicogenómico, el Soulatrólido indujo un mayor número de DEG's en comparación con la mezcla de Mamea A/BA+A/BB (Figura 13). Estas diferencias en el perfil de expresión génica podrían deberse a la diferencia en la estructura química de ambos tipos de coumarinas (Figura 12) (Kleiner et al., 2001). Pues las coumarinas estructuralmente complejas poseen aparentemente una actividad moduladora de la enzima CYP P450 relacionada directamente con su estructura química, además de inducir la tasa de expresión de diferentes factores de transcripción y otras proteínas responsables del transporte de fármacos; por el contrario, las coumarinas con estructuras químicas simples como las Mameas parecen no tener efectos sobre las reacciones de Fase I y Fase II del metabolismo normal de fármacos en hígado (Figura 9) (Kleiner et al., 2008). Nuestros resultados tanto toxicogenómicos como *in silico* están en concordancia con estos estudios, pues el Soulatrólido que es estructuralmente más complejo que las Mameas expresó mayor número de transcritos, correspondientes en su mayoría a diferentes vías del metabolismo de fármacos, a través del CYP P450 (Tabla 11), además en el análisis *in silico* el Soulatrólido mostro aparentemente un perfil con mayor potencial de ser irritante y tener resultados sobre el sistema reproductivo (Tabla 8).

Como parte del análisis toxicogenómico, se utilizó un enfoque de toxicología de sistemas (Waters & Fostel, 2004) mediante el uso de las redes derivadas de las interacciones PPI's con un enfoque dirigido a la predicción de hepatotoxicidad. Como resultado de los análisis de redes para los diferentes motivos de hepatotoxicidad se pudo observar que para ambos tratamientos con las distintas coumarinas (Tabla 12) existían pocos motivos estadísticamente significativos o que se encontraban *upregulated*, en comparación con los controles positivos (CCl₄-8h y APAP 8h-Tabla 13) los cuales se encontraban en su mayoría *upregulated* y fueron estadísticamente significativos a todos los niveles (*Seed*, 1PPI y 2PPI), y con un perfil muy parecido al comportamiento del control negativo (CCl₄-16d-Tabla 13). Estos resultados sugieren que el perfil toxicogenómico de ambos tipos de coumarinas se asocian con un perfil seguro sin generar hepatotoxicidad en ratones. Sin embargo, es importante destacar que el RNAm se somete a muchos procesos post-transcripcionales los cuales pueden afectar los niveles totales de la proteína correspondiente, la

cual a su vez se encuentra sometida a procesos post-traduccionales que pueden influir en sus funciones y por lo tanto también es necesario acompañar este tipo de estudios con los estudios de toxicología tradicional (Hegde, White, & Debouck, 2003). Por este motivo, realizamos adicionalmente un análisis de toxicología clásica mediante métodos histológicos tradicionales (H-E y PAS) en diferentes órganos blanco (hígado, riñón y bazo) de los animales sometidos a tratamiento con las coumarinas (Figuras 15 y 16), además de realizar un análisis de TUNEL en hígado de ratones (Figura 17). Como resultados, no se encontró ningún signo de daño tisular en el hígado, el riñón y el bazo de los ratones tratados, ni la inducción de ningún tipo muerte celular en hígado. Esto sugiere que las coumarinas no presentan un perfil de toxicidad en estos órganos y lo cual confirma los resultados toxicogénicos.

En conclusión de la parte de toxicidad *in vivo*, nuestros resultados representan un paso en el proceso de evaluación de la seguridad en el desarrollo farmacológico del Soulatrólido y la Mammea A/BA y A/BB. En particular, hemos demostrado que los tratamientos con este tipo de coumarinas muestran un perfil seguro como lo demuestran los resultados de los enfoques toxicológicos clásicos y genómicos, lo que apoya su uso en estudios preclínicos y clínicos para continuar con su evaluación. Por otra parte, este estudio refuerza el uso potencial de Soulatrólido y Mammea A/BA + A/BB contra diferentes enfermedades, ya que estos tipo de coumarinas poseen propiedades fisicoquímicas consistentes con moléculas líderes para el desarrollo de nuevos fármacos (Juan C Gomez-Verjan et al., 2014). Es importante señalar que estos compuestos se pueden obtener fácilmente en buenos rendimientos a partir de las partes aéreas de *C. brasiliense* en plantaciones forestales sostenibles (Tapia and Reyes-Chilpa, 2008) o por síntesis química (Defant, Mancini, Tomazzolli, & Balzarini, 2015; Sekino, Kumamoto, Tanaka, Ikeda, & Ishikawa, 2004). Por otra parte, nuestros resultados demuestran la importancia de la toxicogenómica en la búsqueda de nuevos modelos para obtener resultados rápidos y precisos en el proceso de desarrollo de fármacos como procedimientos estándar (Amir-Aslani, 2008; Gusenleitner et al., 2014; Nie et al., 2006; Theodosiou et al., 2013).

In vitro

Los resultados del estudio realizados con el modelo *in vitro* indicaron que la mezcla de coumarinas (Mammea A/BA + A/BB 3:1) presentan actividad citotóxica ($IC_{50}=43.5 \mu M$ 48 h) contra la línea celular de leucemia K562 (Tabla 14 y Figura 18). Esta mezcla en estudios previos demostró tener

baja actividad citotóxica en linfocitos humanos normales *in vitro* con una $CL_{50} = 50.51 \mu\text{g/mL}$ (Abe et al., 2004) mientras que una mezcla de A/BA+A/BB (2:1) resulto inocua al ser administrada en ratones (3500 mg/Kg) (Ruiz-Marcial et al., 2007). Por otra parte, se determinó mediante el ensayo cometa, que dicha mezcla inducia genotoxicidad desde la 1 h de tratamiento (Figura 19) y que aumenta aproximadamente el doble a las 3 h de tratamiento; por ello en este intervalo se realizó el estudio de transcriptoma de células tratadas a las 2 h con la mezcla de las coumarinas. Como resultado de este análisis se estableció que la genotoxicidad era resultado de la aparente inducción de muerte celular por apoptosis (Figura 20), además se encontraron DEG's enriquecidos para la ruta de apoptosis por vía intrínseca (mitocondrial). Para validar estos resultados de manera funcional realizamos el ensayo de TUNEL, observando fragmentación de DNA con morfología particular de apoptosis y muy semejante a la del control a las 24 h (Figura 21B y C). Además, dentro de los DEG's que se encontraron *upregulated*, están las caspasas 3, 7, 9 y 10. Las cuales desempeñan un papel central en la etapa de ejecución de la apoptosis, en particular, la activación de la Caspasa-3 es un evento crucial para activar la apoptosis en las células (González-Sánchez et al., 2011). Por lo cual, se determinó mediante inmunofluorescencia la presencia de la conformación activa de esta enzima a las 18 h de tratamiento (Figura 22D-F). Con lo anterior, pudimos validar los resultados de los microarreglos y demostrar que las mammeas antes mencionadas inducen citotoxicidad en K562 por apoptosis a través de la vía dependiente de caspasas. Sin embargo, esta ruta puede ser activada por la vía mitocondrial, o por inducción de genotoxicidad, por esto se realizó el ensayo de plásmido mellado (Figura 23) en donde no se observó ningún tipo de interacción fisicoquímica entre las coumarinas y el plásmido. Debido a esto, decidimos evaluar la actividad de estos compuestos sobre la morfología de la mitocondria (Figura 24) mediante el análisis de su ultraestructura empleando la técnica de microscopía electrónica de transmisión, como resultado se observó que las coumarinas alteran la ultraestructura mitocondrial (Figura 24B), por lo que la siguiente pregunta fue si la mezcla induce sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , por este motivo se realizó el análisis de las corrientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de células tratadas con la mezcla de las coumarinas. Los resultados (Figura 25) muestran que existe un incremento inmediato en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cuando las células son expuestas a las coumarinas. Lo anterior, complementa los resultados anteriores en donde observamos daño genotóxico desde la 1 h y sugiere un posible mecanismo de acción mediante el cual las coumarinas ejercen su efecto citotóxico, por esta ruta. Nuestros resultados, concuerdan con estudios previos de otras coumarinas de tipo Mamea también aisladas de *C. brasiliense*, como Gut-70, Calofilólido y

Mammea B/BB, que también demostraron la inducción de apoptosis a través de la activación de las caspasas en células de leucemia humanas (Ito et al., 2006; Kimura et al., 2005). Además, la Mammea A/BB provocó hinchamiento de la matriz mitocondrial, daño a la membrana de este organelo y la presencia de vesículas atípicas dentro de este organelo. En conclusión, estos experimentos demostraron que las coumarinas tipo Mammea (A/BA y A/BB) poseen propiedades citotóxicas sobre la línea celular K562, induciendo la generación de cascadas de señalización que incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular lo cual lleva a la muerte celular de tipo apoptosis por vía intrínseca. Sin embargo, faltan ver otros mecanismos de actividad como las cualidades pro oxidantes de las coumarinas, y la probabilidad de que la concentración $[Ca^{2+}]_i$ provenga de retículo endoplásmico y no necesariamente de mitocondria (Figura 26).

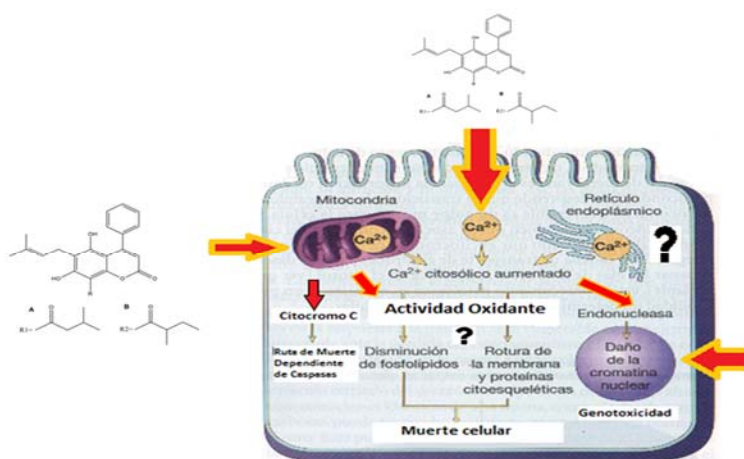


Figura 26. Posibles blancos y mecanismo de acción de las coumarinas tipo Mammea A/BA+A/BB. En flecha rojas se encuentran los posibles blancos y en signos de interrogación los probables mecanismos de acción a evaluar en perspectiva.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSIONES

Nuestros resultados representan un paso importante en el proceso de desarrollo de la coumarina tetracíclica Soulatrólido y las coumarinas tipo Mamea A/BA y A/BB aisladas de los diferentes quimiotipos de *C. brasiliense*, en conjunto muestran propiedades fisicoquímicas con potencial farmacológico para ser consideradas como moléculas líderes (ninguna viola las reglas de Lipinski) en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de parasitosis, leucemia, tuberculosis y VIH. Aunado a esto, se demostró *in vivo* que los tratamientos con estos compuestos en ratones CD-1 presentan un perfil toxicogenómico inócuo y seguro, confirmado por los resultados de los enfoques toxicológicos clásicos (Lorke e histopatología).

En cuanto a la parte mecanística, nuestros experimentos confirmaron que las coumarinas tipo Mamea (A/BA y A/BB) poseen propiedades citotóxicas sobre la línea de leucemia K562 (43.5 μM), induciendo la generación de cascadas de señalización que incrementan la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fases muy tempranas de exposición, lo cual lleva a la muerte celular de tipo apoptosis por vía intrínseca. Este es el primer reporte en el cual se demuestra que las coumarinas tipo Mamea (A/BA+A/BB); inducen este mecanismo de acción y se destaca su potencial para ser utilizados en la quimioterapia genotóxica contra el cáncer.

Finalmente, es importante señalar que nuestro estudio refuerza la importancia de la protección de los recursos naturales de nuestro país, pues estos compuestos se podrían obtener en buenos rendimientos a partir de plantaciones forestales sostenibles de *C. brasiliense* (Tapia and Reyes-Chilpa, 2008), el cual es un árbol que crece en la selva tropical húmeda de los estados del sureste de México, y que normalmente es utilizado para elaborar muebles. Por otra parte, nuestros resultados demuestran la importancia de la toxicogenómica preventiva en la búsqueda de nuevos modelos para obtener resultados rápidos y precisos en el proceso de desarrollo de fármacos, buscando establecer procedimientos estándar con este tipo de tecnologías *ómicas* (Amir-Aslani, 2008; Gusenleitner et al., 2014; Nie et al., 2006; Theodosiou et al., 2013).

7.2.PERSPECTIVAS

Es necesario completar con otro tipo de estudios toxicológicos (crónico, subcrónica y teratogénicos), sobre Soulatrólido, a fin de confirmar, si es que tendrá efectos adversos en el sistema reproductivo y como irritante.

Estudiar las posibles cascadas de señalización que son estimuladas por las coumarinas tipo Mamea A/BB y A/BB, para confirmar si la inducción de Ca^{2+} es por vía mitocondrial o por retículo endoplásmico y sobre que receptores están actuando.

Realizar estudios con modelos *in vivo* de leucemia con la mezcla de las coumarinas tipo Mamea A/BA+A/BB para confirmar la aparente especificidad de estos compuestos, y en su caso comenzar con estudios biofarmacéuticos para estudiar sus propiedades ADME.

8.REFERENCIAS

- Abbas, J. (2014). Antiplasmodial evaluation of one compound from *Calophyllum flavoranulum*, 14(2), 185–191.
- Abe, F., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes, M., & Reyes-Chilpa, R. (2004). Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(January), 141–143.
- Abe, F., Nagafuji, S., Okawa, M., Kinjo, J., Akahane, H., Ogura, T., ... Reyes-Chilpa, R. (2005). Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(7), 1314–1317.
- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Reyes-Chilpa, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(9), 1188–1191.
- Amir-Aslani, A. (2008). Toxicogenomic predictive modeling: Emerging opportunities for more efficient drug discovery and development. *Technological Forecasting and Social Change*, 75(7), 905–932.
- Arrowsmith, J. (2011). Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. *Nat Rev Drug Discov*, 10(5), 328–329.
- Asir, N. A. M. a D. N., Ahmani, M., Haari, K., & Assim, N. (2013). Xanthones from *Calophyllum gracilipes* and Their Cytotoxic Activity, 42(9), 1261–1266.
- Ayala, M. C., Gonz, Y., & Ndez, H. Á. (2004). Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta en Células Sanguíneas Humanas, 23(3), 277–284.
- Barrett, T., & Edgar, R. (2006). Gene Expression Omnibus (GEO): Microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods in Enzymology*, 411, 352–369.
- Barrow, P. C. (2009). Reproductive toxicity testing for pharmaceuticals under {ICH}. *Reproductive Toxicology*, 28(2), 172–179.
- Berkow, R., & Fletcher, A. J. (1988). The Merck Manual, ed. 15. *American Journal of Ophthalmology*, 105(5), pp 570
- Blanco-Ayala, T., Lugo-Huitrón, R., Serrano-López, E. M., Reyes-Chilpa, R., Rangel-López, E., Pineda, B., Torres-Ramos, M. (2013). Antioxidant properties of xanthones from *Calophyllum brasiliense*: prevention of oxidative damage induced by FeSO₄. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 262.

Boess, F., Kamber, M., Romer, S., Gasser, R., Muller, D., Albertini, S., & Suter, L. (2003). Gene Expression in Two Hepatic Cell Lines, Cultured Primary Hepatocytes, and Liver Slices Compared to the in Vivo Liver Gene Expression in Rats: Possible Implications for Toxicogenomics Use of in Vitro Systems. *Toxicological Sciences*, 73(2), 386–402.

Brenzan, M. A., Nakamura, C., Prado Dias Filho, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M., & Aparício Garcia Cortez, D. (2007). Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, 101(3), 715–722.

Brenzan, M. A., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Ueda-Nakamura, T., Young, M. C. M., Côrrea, A. G., Cortez, D. (2008). Structure-activity relationship of (-) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy=Biomédecine & Pharmacothérapie*, 62(9), 651–8.

Brenzan, M. A., Santos, A. O., Nakamura, C. V., Filho, B. P. D., Ueda-Nakamura, T., Young, M., Cortez, D. A. G. (2012). Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. Urban & Fischer Verlag.

Butler, M. S. (2005). Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.*, 22(2), 162–195.

Butler, M. S., Robertson, A. A. B., & Cooper, M. A. (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.*, 31(11), 1612–1661.

Campos, G., Schmidt-Heck, W., Ghallab, A., Rochlitz, K., Pütter, L., Medinas, D. B., ... Godoy, P. (2014). The transcription factor CHOP, a central component of the transcriptional regulatory network induced upon CCl₄ intoxication in mouse liver, is not a critical mediator of hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 88(6), 1267–80.

Capó, M. A., & Frejo, M. T. (2007). Toxicogenómica : Una nueva rama de la toxicología. *Medicina Balear*, 22(3), 25–29.

Cechinel Filho, V., Meyre-Silva, C., & Niero, R. (2009). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 6(3), 313–327.

Chan, K. M., Hamzah, R., Rahaman, A. A., Jong, V. Y. M., Khong, H. Y., Rajab, N. F., ... Inayat-Hussain, S. H. (2012). The pyranoxanthone inophyllin A induces oxidative stress mediated-apoptosis in Jurkat T lymphoblastic leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2916–2922.

Chen, M., Bisgin, H., Tong, L., Hong, H., Fang, H., Borlak, J., & Tong, W. (2014). Toward predictive models for drug-induced liver injury in humans: are we there yet? *Biomarkers in Medicine*, 8(2), 201–13.

Cragg, G. M., Grothaus, P. G., & Newman, D. J. (2014). New Horizons for Old Drugs and Drug Leads.

Creagh, T., Ruckle, J. L., Tolbert, D. T., Giltner, J., Eiznhamer, D. A., Dutta, B., ... Xu, Z.-Q. (2001). Safety and Pharmacokinetics of Single Doses of (+)-Calanolide A, a Novel, Naturally Occurring Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, in Healthy, Human Immunodeficiency Virus-Negative Human Subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1379–1386.

Crombie, L., Games, D. E., & McCormick, A. (1966). Isolation and structure of mammea A/BA, A/AB and A/BB: A group of 4-aryl-coumarin extractives of *L. Tetrahedron Letters*, 7(2), 145–149.

Currie, R. A. (2012). Toxicogenomics: The challenges and opportunities to identify biomarkers, signatures and thresholds to support mode-of-action. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746(2), 97–103.

Davis, A. P., Murphy, C. G., Johnson, R., Lay, J. M., Lennon-Hopkins, K., Saraceni-Richards, C., ... Mattingly, C. J. (2013). The Comparative Toxicogenomics Database: update 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D1104–D1114.

Defant, A., Mancini, I., Tomazzolli, R., & Balzarini, J. (2015). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2H-Pyran-2-one Derivatives as Potential HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 348(1), 23–33.

Dharmaratne, H. R. W., Wanigasekera, W. M. A. P., Mata-Greenwood, E., & Pezzuto, J. M. (1998). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Activity by Cordatolides Isolated from *Calophyllum cordato-oblongum*. *Planta Med*, 64(05), 460–461.

Díaz, D. M. V. (2013). Multivariate analysis of morphological and anatomical characters of *Calophyllum* (Calophyllaceae) in South America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), 587–626. d

Do Carmo Souza, M., Beserra, A. M. S., Martins, D. C., Real, V. V., dos Santos, R. A. N., Rao, V. S., ... de Oliveira Martins, D. T. (2009). In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 452–458.

Doktorova, T. Y., Ates, G., Vinken, M., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2014). Way forward in case of a false positive in vitro genotoxicity result for a cosmetic substance? *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 28(1), 54–59.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., ... Kleiner, J. (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2-3), 193–236.

Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P. (2000). Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(20), 3714–3717.

Ertl, P., & Schuffenhauer, A. (2008). Cheminformatics analysis of natural products: lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progrès Des Recherches Pharmaceutiques*, 66.

Feldman, A., & Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In C. E. Day (Ed.), *Histopathology SE* - 3 (Vol. 1180, pp. 31–43). Springer New York.

Fielden, M. R., Brennan, R., & Gollub, J. (2007). A Gene Expression Biomarker Provides Early Prediction and Mechanistic Assessment of Hepatic Tumor Induction by Nongenotoxic Chemicals. *Toxicological Sciences*, 99(1), 90–100.

Filho, V., Meyre-Silva, C., & Niero, R. (2009). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 6(3), 313–327.

Gámez, R. (2007). Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados, 38(3), 204–208.

García-Zebadúa, J. C., Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M., Castillo-Arellano, J. I., Santillán-Hernández, S., Vázquez-Astudillo, B., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2014). El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: Una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae*, 21(2), 126–145.

García-Zebadúa, Magos-Guerrero G., Mumbrú-Massip M., Estrada-Muñoz E., Contreras-Barrios M.A. Huerta-Reyes M., Campos-Lara M., & Reyes-Chilpa R. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia*, 82(7), 1027–34.

Gee, P., Mitchell, R., Browne, L., Kolaja, K., Jarnagin, K., Natsoulis, G., & Roter, A. (2003). 308 Drugmatrix™ provides predictive chemogenomics solutions for safety assessment in drug discovery and development. *Toxicology Letters*, 144, Supplement 1, s85.

Goldman, M. (2012). The Innovative Medicines Initiative: A European Response to the Innovation Challenge. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 91(3), 418–425.

Gomez-Verjan, J. C., Estrella-Parra, E. A., Gonzalez-Sanchez, I., Rivero-Segura, N. A., Vazquez-Martinez, R., Magos-Guerrero, G., Reyes-Chilpa, R. (2015). Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Genomics Data*, 6, 258–259.

Gomez-Verjan, J. C., Estrella-Parra, E. A., González-Sánchez, I., Vázquez-Martínez, E. R., Vergara-Castañeda, E., Cerbón, M. A., & Reyes-Chilpa, R. (2014). Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), 1189–1195.

Gómez-Verjan, J., Gonzalez-Sanchez, I., Estrella-Parra, E., & Reyes-Chilpa, R. (2015). Trends in the chemical and pharmacological research on the tropical trees *Calophyllum brasiliense* and *Calophyllum inophyllum*, a global context. *Scientometrics*, 1–12.

González-Sánchez, I., Solano, J. D., Loza-Mejía, M. A., Olvera-Vázquez, S., Rodríguez-Sotres, R., Morán, J., Cerbón, M. A. (2011). Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 2102–2108.

- Group, T.H.E.A.P. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.
- Gunasekera, S. P., Jayatilake, G. S., Selliah, S. S., & Sultanbawa, M. U. S. (1977). Chemical investigation of ceylonese plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium* Thw. and *Calophyllum soulattri* Burm. f. (Guttiferae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (13), 1505–1511.
- Gusenleitner, D., Auerbach, S. S., Melia, T., Gómez, H. F., Sherr, D. H., & Monti, S. (2014). Genomic models of short-term exposure accurately predict long-term chemical carcinogenicity and identify putative mechanisms of action. *PLoS ONE*, 9(7).
- Habib, A., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2011). Short-term in vitro and in vivo genotoxicity testing systems for some water bodies of Northern India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 180(1-4), 87–95.
- Hartung, T. (2013). Toxicology and drug development, 30(3), 275–291.
- Hegde, P. S., White, I. R., & Debouck, C. (2003). Interplay of transcriptomics and proteomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 647–651.
- Herzog, C., Seth, R., Shah, S. V., & Kaushal, G. P. (2007). Role of meprin A in renal tubular epithelial cell injury. *Kidney Int*, 71(10), 1009–1018.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2008). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protocols*, 4(1), 44–57.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M. D. C., Abe, F., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., & Reyes-Chilpa, R. (2004a). HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(September), 1471–1475.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M. D. C. d. e. I. C., Abe, F., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., & Reyes-Chilpa, R. (2004b). HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(9), 1471–1475.
- Igarashi, Y., Nakatsu, N., Yamashita, T., Ono, A., Ohno, Y., Urushidani, T., & Yamada, H. (2014). Open TG-GATEs : a large-scale toxicogenomics database Open TG-GATEs Toxygates, 1–7.
- Ito, C., Murata, T., Itoigawa, M., Nakao, K., Kaneda, N., & Furukawa, H. (2006). Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(7), 975–980.
- Jean, P. (1957). Structure chimique du calophyllolide, de l'inophyllolide et de l'acide calophyllique, constituants des noix de *Calophyllum inophyllum*. *Bull Soc Chim*, 1079.

Jin, L., Tabe, Y., Kimura, S., Zhou, Y., Kuroda, J., Asou, H., ... Miida, T. (2011). Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *British Journal of Cancer*, *104*(1), 91–100.

Kalyanaraman, L., Ganesh, K. K. S., Kumar, R. M., Pichai, R., Narasimhan, S., & Vyas, K. (2012). An nmr and lc-ms based mixture analysis approach for structural elucidation of antimicrobial derivatives of Calophyllolide. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *35*(12), 1649–1661.

Kashman, Y., Gustafson, K. R., Fuller, R. W., Cardellina, J. H., McMahon, J. B., Currens, M. J., ... Boyd, M. R. (1992). The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, *35*(15), 2735–2743.

Katzung, B. G. (2015). Introduction to Autonomic Pharmacology. In B. G. Katzung & A. J. Trevor (Eds.), *Basic & Clinical Pharmacology*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Medical.

Kawamura, F., Muhamud, A., Hashim, R., Sulaiman, O., & Ohara, S. (2012). Two Antifungal Xanthenes from the Heartwood of *Calophyllum Symingtonianum*. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, *46*(2), 181–185.

Keller, T. H., Pichota, A., & Yin, Z. (2006). A practical view of “druggability”. *Current Opinion in Chemical Biology*, *10*(4), 357–61.

Khan, S. R., Baghdasarian, A., Fahlman, R. P., Michail, K., & Siraki, A. G. (2014). Current status and future prospects of toxicogenomics in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *19*(5), 562–578.

Kimura, S., Ito, C., Jyoko, N., Segawa, H., Kuroda, J., Okada, M., ... Maekawa, T. (2005). Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *113*(1), 158–165.

Kleiner, H. E., Vulimiri, S. V, Miller, L., Johnson, W. H., Whitman, C. P., & DiGiovanni, J. (2001). Oral administration of naturally occurring coumarins leads to altered phase I and II enzyme activities and reduced DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons in various tissues of SENCAR mice. *Carcinogenesis*, *22* (1), 73–82.

Kleiner, H. E., Xia, X., Sonoda, J., Zhang, J., Pontius, E., Abey, J., DiGiovanni, J. (2008). Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *232*(2), 337–50.

Knudsen, T. B. (2013). Teratogenic Mechanisms , Pathways and Processes.

Li, J. W., & Vederas, J. C. (2014). Drug Discovery and Natural Products ;, *161*(2009).

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3–26.
- Liu, W.-H., Liu, Y.-W., Chen, Z.-F., Chiou, W.-F., Tsai, Y.-C., & Chen, C.-C. (2015). Calophyllolide Content in *Calophyllum inophyllum* at Different Stages of Maturity and Its Osteogenic Activity. *Molecules*, 20(7), 12314.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54(4), 275–287.
- Luna-Moreno, D., Vázquez-Martínez, O., Báez-Ruiz, A., Ramírez, J., & Díaz-Muñoz, M. (2007). Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 632–643.
- Mah, S., Ee, Teh, S., Rahmani, M., Lim, Y. M., & Go, R. (2012). Phylatrin, a New Cytotoxic Xanthone from *Calophyllum soulattri*. *Molecules*, 17(7), 8303.
- Mah, S. H., Lian, E. G., Teh, S. S., & Sukari, M. A. (2015). Antiproliferative xanthone derivatives from *Calophyllum inophyllum* and *Calophyllum soulattri*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 425–429.
- Matsuda, K., Hattori, S., Kariya, R., Komizu, Y., Kudo, E., Goto, H., ... Okada, S. (2015). Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(3), 288–294.
- Maurici, D., Aardema, M., Corvi, R., Kleber, M., Krul, C., Laurent, C., Phillips, B. (2015). Establishment of timetables for the phasing out of animal experiments for cosmetics Genotoxicity/mutagenicity 1 . State of the art in the field of genotoxicity and mutagenicity tests in the view of the 7th Amendment, 1–25.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335.
- Nguyen, L.-T. T., Nguyen, D. M., & Nguyen, L.-H. D. (2013). A new xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii*. *Natural Product Research*, 27(6), 563–567.
- Nguyen, L.-T. T., Nguyen, H. T., Barbič, M., Brunner, G., Heilmann, J., Pham, H. D., ... Nguyen, L.-H. D. (2012). Polyisoprenylated acylphloroglucinols and a polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii*. *Tetrahedron Letters*, 53(34), 4487–4493.
- Nie, A. Y., McMillian, M., Brandon Parker, J., Leone, A., Bryant, S., Yieh, L., ... Lord, P. G. (2006). Predictive toxicogenomics approaches reveal underlying molecular mechanisms of nongenotoxic carcinogenicity. *Molecular Carcinogenesis*, 45(12), 914–933.

Patil, A. D., Freyer, A. J., Eggleston, D. S., Haltiwanger, R. C., Bean, M. F., Taylor, P. B., ... Bartus, H. R. (1993). The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36(26), 4131–4138.

Pengsuparp, T., Serit, M., Hughes, S. H., Soejarto, D. D., & Pezzuto, J. M. (1996). Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Mediated by Soulatrolide, a Coumarin Isolated from the Latex of *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products*, 59(9), 839–842.

Pires, C. T. A. T., Brenzan, M. A. A., Scodro, R. B. de L. B., Cortez, D. A. G. A., Lopes, L. D. G. D., Siqueira, V. L. D. L., & Cardoso, R. F. F. (2014). Anti-Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(3), 324–329.

Rafols, I., Hopkins, M. M., Hoekman, J., Siepel, J., O'Hare, A., Perianes-Rodríguez, A., & Nightingale, P. (2014). Big Pharma, little science? *Technological Forecasting and Social Change*, 81, 22–38.

Rea, A., Tempone, A. G., Pinto, E. G., Mesquita, J. T., Rodrigues, E., Silva, L. G. M., ... Lago, J. H. G. (2013). Soulamarin isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(12), e2556.

Reyes-Chilpa, R., Baggio, C. H., Alavez-Solano, D., Estrada-Muñiz, E., Kauffman, F. C., Sanchez, R. I., & Mesia-Vela, S. (2006). Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 167–172.

Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Apan, T. R. R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C. K., & Vázquez-Torres, M. (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences*, 75(13), 1635–1647.

Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., & Hernández-Ortega, S. (2008). Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(August), 431–436.

Römer, M., Eichner, J., Metzger, U., Templin, M. F., Plummer, S., Ellinger-Ziegelbauer, H., & Zell, A. (2014). Cross-Platform Toxicogenomics for the Prediction of Non-Genotoxic Hepatocarcinogenesis in Rat. *PLoS ONE*, 9(5), e97640.

Ruiz-Marcial, C., Reyes Chilpa, R., Estrada, E., Reyes-Esparza, J., Fariña, G. G. G., & Rodríguez-Fragoso, L. (2007). Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(5), 719–725.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*. London.

- Sekino, E., Kumamoto, T., Tanaka, T., Ikeda, T., & Ishikawa, T. (2004). Concise Synthesis of Anti-HIV-1 Active (+)-Inophyllum B and (+)-Calanolide A by Application of (-)-Quinine-Catalyzed Intramolecular Oxo-Michael Addition. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(8), 2760–2767.
- Standley, P. C. (1932). Revision of some American species of *Calophyllum*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 3(66), 557–571.
- Stevens, P. F. (1980). A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 61, 117–699.
- Su, X.-H. H., Zhang, M.-L. L., Li, L.-G. G., Huo, C.-H. H., Gu, Y.-C. C., & Shi, Q.-W. W. (2008). Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(12), 2579–2608.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., ... Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550.
- Suter, L., Babiss, L. E., & Wheeldon, E. B. (2004). Toxicogenomics in Predictive Toxicology in Drug Development. *Chemistry & Biology*, 11(2), 161–171.
- Tapia Tapia, E.C., Reyes Chilpa, R. (2008). Productos forestales no maderables en México : Aspectos económicos para el desarrollo sustentable Mexican non-wood forest products : economic aspects for sustainable development. *Maderas Y Bosques*, 14(3), 95–112.
- Tejada, F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos, 3(3), 177–191.
- Theodosiou, M., Amir-Aslani, A., & Mégarbane, B. (2013). Emerging technologies and challenges for better and safer drugs. *Biotechnology Letters*, 36(4), 677–684.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221.
- Tiuman, T. S., Brenzan, M. A., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. , Cortez, D., & Nakamura, C. V. (2012). Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. *Phytomedicine*, 19(13), 1196–1199.
- Tran, L. C. (1996). *Contribution a l'etude du genre Calophyllum: Botanique, Chimie et Pharmacologie*.
- Ulrich, R., & Friend, S. H. (2002). Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs? *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(1), 84–88.
- Waters, M. D., & Fostel, J. M. (2004). Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature Reviews Genetics*, 5(12), 936–948.

Waters, M. D., Jackson, M., & Lea, I. (2010). Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and toxicogenomics methods. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(3), 184–200. d

Williams, D. P., Garcia-Allan, C., Hanton, G., LeNet, J. L., Provost, J. P., Brain, P., ... Park, B. K. (2004). Time Course Toxicogenomic Profiles in CD-1 Mice after Nontoxic and Nonlethal Hepatotoxic Paracetamol Administration. *Chemical Research in Toxicology*, 17(12), 1551–1561.

Xu, J., Kelly, R., Fang, H., & Tong, W. (2010). ArrayTrack: a free FDA bioinformatics tool to support emerging biomedical research - an update. *Human Genomics*.

Xu, Z.-Q., Barrow, W. W., Suling, W. J., Westbrook, L., Barrow, E., Lin, Y.-M., & Flavin, M. T. (2004). Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(5), 1199–1207.

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., ... Reyes-Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 293–299.

Zavaleta-Mancera, H., Reyes-Chilpa, R., & García-Zebadua, J. (2011). Leaf Structure of Two Chemotypes of *Calophyllum brasiliense* from Mexico. *Microscopy and Microanalysis*, 17(Supplement S2), 340–341.

9.ANEXOS



Risk assessment of Soulatrolide and Mammea (A/BA+A/BB) coumarins from *Calophyllum brasiliense* by a toxicogenomic and toxicological approach



J.C. Gomez-Verjan ^a, E. Estrella-Parra ^a, E.R. Vazquez-Martinez ^b, I. Gonzalez-Sanchez ^a, G. Guerrero-Magos ^c, D. Mendoza-Villanueva ^d, L. Isus ^e, A. Alfaro ^f, M. Cerbón-Cervantes ^b, P. Aloy ^{e, g}, R. Reyes-Chilpa ^{a, *}

^a Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM, Mexico City, Mexico

^b Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM, Mexico City, Mexico

^c Laboratorio de Fitofarmacología, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, México City, Mexico

^d Laboratory of Cell and Developmental Signaling, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, USA

^e Joint IRB-BSC-CRG Program in Computational Biology, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona, Catalonia, Spain

^f Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México, Ciudad de México, Mexico

^g Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2015

Received in revised form

8 February 2016

Accepted 12 March 2016

Available online 16 March 2016

Keywords:

Coumarins

Toxicogenomics

Mammea A/BA+A/BB

Soulatrolide

Toxicology

Calophyllum brasiliense

ABSTRACT

Calophyllum brasiliense (Calophyllaceae) is a tropical rain forest tree distributed in Central and South America. It is an important source of tetracyclic dipyrano coumarins (Soulatrolide) and Mammea type coumarins. Soulatrolide is a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase and displays activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Meanwhile, Mammea A/BA and A/BB, pure or as a mixture, are highly active against several human leukemia cell lines, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Nevertheless, there are few studies evaluating their safety profile. In the present work we performed toxicogenomic and toxicological analysis for both type of compounds. Soulatrolide, and the Mammea A/BA + A/BB mixture (2.1) were slightly toxic according to Lorke assay classification ($DL_{50} > 3000$ mg/kg). After a short-term administration (100 mg/kg/daily, orally, 1 week) liver toxicogenomic analysis revealed 46 up and 72 downregulated genes for Mammea coumarins, and 665 up and 1077 downregulated genes for Soulatrolide. Gene enrichment analysis identified transcripts involved in drug metabolism for both compounds. In addition, network analysis through protein–protein interactions, tissue evaluation by TUNEL assay, and histological examination revealed no tissue damage on liver, kidney and spleen after treatments. Our results indicate that both type of coumarins displayed a safety profile, supporting their use in further preclinical studies to determine its therapeutic potential.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Natural products are a valuable source for drug discovery in the pharmaceutical industry, specially for the obtention of active

compounds, pharmacophores, precursors for hemisynthesis and in general for the development of new drugs (Butler et al., 2014; Newman and Cragg, 2012). In this context *Calophyllum brasiliense* (Calophyllaceae) is a tropical rain forest tree distributed from Brasil to Mexico that can reach 40 m height and 1–3 m of diameter (Fig. 1). This species have been used in traditional medicine of different countries to treat diverse diseases such as inflammation, herpes, gastrointestinal diseases, pain, diabetes, viral and tumor affections (Cechinel Filho et al., 2009; García-Zebadúa et al., 2014). *C. brasiliense* is the most studied species of *Calophyllum* genus in America (Gómez-Verjan et al., 2015), and is an important source of highly active natural products (coumarins, xanthenes, flavonoids,

Abbreviations: DEG's, Differential Expressed Genes; PPI, Protein–Protein Interaction; CTD, Comparative Toxicogenomics Data Base; DAVID, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery.

* Corresponding author. Depto. Productos Naturales, Intituto de Química, UNAM, Del. Coyoacan, 04510 Mexico City, Mexico.

E-mail addresses: carlosverjan@comunidad.unam.mx (J.C. Gomez-Verjan), chilpa@unam.mx (R. Reyes-Chilpa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.010>

0278-6915/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Fig. 1. *Calophyllum brasiliense* specimen from Veracruz, Mexico.

and terpenoids) that display anti-HIV, cytotoxic, antineoplastic, antiparasite, antispasmodic, antinociceptive, and antiulcer properties (Abe et al., 2002; Brenzan et al., 2012; Brenzan and Nakamura, 2007; do Carmo Souza et al., 2009; García-Zebadúa et al., 2014; Huerta-Reyes et al., 2004; Pires et al., 2014; Reyes-Chilpa et al., 2008). In particular, coumarins extracted from the leaves of *C. brasiliense* are responsible for many of the pharmacological activities attributed to this species. In Mexico it has been found two different chemical phenotypes (chemotypes) based on the type of coumarins that each specimen biosynthesizes (Zavaleta-Mancera et al., 2011).

The first chemotype (CT-1) of *C. brasiliense* synthesizes mammae type 5,7-dihydroxycoumarins, such as Mammae A/BA, A/BB, B/BA,

B/BB, C/AO, C/OB, B/BA, B/BA F cycle, and B/BB F cycle (Reyes-Chilpa et al., 2004). Mammae A/BA and A/BB (Fig. 2) isolated from the leaves have shown cytotoxic activity against several human cancer cell lines, such as prostate cancer cell line (PC3), human colorectal carcinoma (HTC116) and glioblastoma cell line (U251), and specially leukemia. Several reports demonstrated that these coumarins display high cytotoxic activity against five human leukemic cell lines (BV173, K562, NALM6, HL60, and SEM a P-glycoprotein over-expressing cell line) with IC_{50} 's in the range of 0.04–0.59 μ M. Interestingly, in most of the leukemic cell lines, mammae A/BA and A/BB type coumarins induces a caspase-mediated cell death (Ito et al., 2006; Gomez-Verjan et al., 2014; Reyes-Chilpa et al., 2004). Moreover, it has been described the antiproliferative and antitumor activity of a mixture of Mammae A/BA + A/BB-(2:1) in a murine model implanted with baby mouse kidney cells (BMK), showing an inhibition of 83% in the tumor size after four weeks of treatment (Ruiz-Marcial et al., 2007). In addition, Mammae A/BA and A/BB coumarins display antiparasite properties against *Trypanosoma cruzi* (Reyes-Chilpa et al., 2008) and *Leishmania amazonensis*, inducing swelling of the mitochondrial membrane and disruption in ultrastructure of this organelle (Brenzan and Nakamura, 2007). Mammae A/BB has also shown an IC_{50} of 82.51 μ M against the *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, as well as against several clinical isolates of this bacteria with minimum inhibitory concentrations (MIC's) in the range of 76.85–153.9 μ M (Pires et al., 2014).

The second chemotype (CT-2) of *C. brasiliense* contains dipyrano-tetracyclic coumarins, such as calanolides (A, B, C, D, and E), inophyllums, for instance soulatrolide, cordatolides, and chromanones, such as apetalic acid (Huerta-Reyes et al., 2004). Interestingly, dipyrano-tetracyclic coumarins possess high activity against HIV-1, inhibiting viral reverse transcriptase (RT-HIV-1). For instance, Calanolide A inhibits RT-HIV-1 with an IC_{50} of 100 nM (Kashman et al., 1992). Calanolide A reached clinical phase II (Butler, 2005) where it was found to be well tolerated and got therapeutical levels in plasma, showing low intensity side effects, such as headache and dizziness (Creagh et al., 2001). Regarding to inophyllums, Soulatrolide (Fig. 2) is a potent and specific inhibitor of the reverse transcriptase from HIV-1 (RT-HIV-1) with an IC_{50} of 0.34 μ M and remarkable specificity, with no appreciable activity towards reverse transcriptases of HIV-2 (RT-HIV-2), avian myeloblastosis virus (RT-AMV), RNA or DNA polymerase (Pengsuparp et al., 1996). In addition, Soulatrolide, as well as other related coumarins, have shown to be active against *M. tuberculosis*

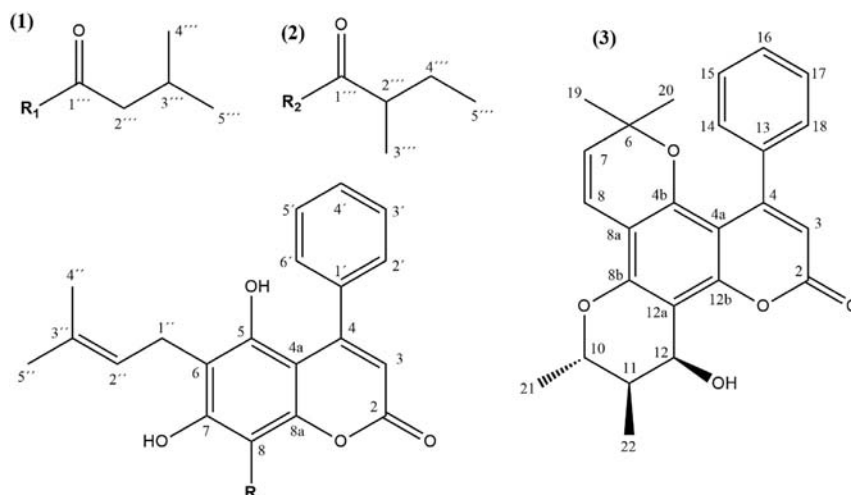


Fig. 2. Coumarins isolated from *C. brasiliense*. 1) Mammae A/BA: R1. 2) Mammae A/BB: R2. 3) Soulatrolide.

(MIC = 3.13 µg/ml), a pathogen commonly associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (Xu et al., 2004), showing its potential as a dual agent in HIV related diseases.

Interestingly, Soulatrolide and Mammea A/BA or A/BB type coumarins possess potential to be introduced into the clinic, since these compounds also follow Lipinski rule of Five (Gomez-Verjan et al., 2014). Nevertheless, toxicological and adverse properties of these compounds remains to be evaluated, since toxicological issues cause 20–40% of failures of novel active compounds in the initial stages of drug development (Theodosiou et al., 2013), and should be detected before expensive clinical testing is carried out, which in turn represents 95% of failure in the clinical phases (Arrowsmith, 2011). In this context, next generation of drug discovery and development technologies such as toxicogenomics, represent important novel tools for preclinical toxicity testing and prediction for drug development in contrast to classical traditional studies (Khan et al., 2014).

Toxicogenomics is an interdisciplinary research field that combines genome wide technologies with conventional toxicology. The use of high throughput microarrays has become a powerful method for toxicity assessment, which identifies the induction of genes known to be associated with a toxic pathway (Amir-Aslani, 2008). Toxicogenomics data analysis and interpretation by bioinformatic tools such as network analysis provide a rapid and reliable tool to identify the molecular toxicological profile of novel compounds (Theodosiou et al., 2013). In the present work we have performed an *in vivo* toxicogenomic analysis of the pharmacological active coumarins, Soulatrolide and Mammea A/BA and A/BB isolated from *C. brasiliense*, through the use of high density microarrays together with computational network analysis, as well as with classical toxicological approaches such as histopathology and Lorke assay.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and identification of coumarins

2.1.1. Mammea A/BA + A/BB

The leaves of *C. brasiliense*, chemotype (CT-1) were collected in the State of Veracruz, Mexico in January 2014. Vouchers were deposited at the “Instituto Mexicano del Seguro Social” Medicinal Herbarium (IMSSM) with numbers 16131, 16132 and 16133. The leaves were dried at room temperature and then powdered (1 kg). The extract was prepared by maceration with hexane until exhaustion, and then concentrated ‘*in vacuo*’ in a rotary evaporator. Compounds were isolated using column chromatography on silica gel-60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR (Table 1), IR, UV and compared with previous reports (Crombie et al., 1966; Gasparotto and Brenzan, 2005; Reyes-Chilpa et al., 2004). The yield of mammea coumarins was estimated as 1.5% of the leaves dry weight. For biological assays, a mixture of coumarins, Mammea A/BA and Mammea A/BB at a ratio of 3:1 was used. The content of each compound in the mixture was determined by ¹H NMR using integration of OH-7, and assuming 100% for both compounds (Table 1).

2.1.2. Soulatrolide

The leaves of *C. brasiliense* chemotype (CT-2) were collected in the State of Veracruz, Mexico in January 2014. Vouchers were deposited at the IMSSM with numbers 16134 and 16135. Leaves were dried at room temperature and then powdered (700 g). The extracts were prepared by maceration with hexane, acetone and MeOH. Extraction with each solvent lasted 72 h, then powder was filtered and extracted again with new solvent until exhaustion. The organic extracts prepared with each solvent were pooled and concentrated ‘*in vacuo*’ in a rotary evaporator and

residual solvent was evaporated to dryness at room temperature. The yields of the extracts were 3% (hexane), 7% (acetone), and 8% (MeOH). Soulatrolide was isolated using column chromatography on silica gel-60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, UV, optical rotation, and found in good agreement with previous reports for Soulatrolide (Gunasekera et al., 1977) (Table 2). The yield of Soulatrolide was estimated as 1% of the leaves dry weight.

2.2. Toxicology

2.2.1. Acute toxicity (Lorke assay)

The acute toxicity study was conducted in accordance with Lorke's method using male mice (CD-1 strain) (Charles River Laboratories International Inc. Hollister, CA, USA (Lorke, 1983). Briefly, the tested extracts and compounds were: Hexane extract of CT-1 and CT-2, Soulatrolide and Mammea mixture. The extracts were orally administered using corn oil as vehicle (Mazola®). The control mice group was treated with 0.9% isotonic saline solution (ISS). Compounds were dissolved in DMSO and diluted with water (5% v/v). The study was conducted in 2 phases; in the first phase tested doses were 10, 100 and 1000 mg/kg body weight, in the second phase, specific doses (1600, 2900 and 5000 mg/kg) of each compound were given to one mouse per dose to further determine the correct LD₅₀ value. Mice were divided into groups of 3 animals per dose. All animals were observed frequently on the day of treatment and surviving animals were monitored daily for 2 weeks for signs of acute toxicity. At the end of 14 days, all surviving mice were sacrificed and then autopsied and the internal organs (liver, brain, spleen, kidney, heart, and testis) examined macroscopically for pathological changes. The weights of these organs were also taken and mean organ-body weight ratios calculated and compared with those of the control group.

2.2.2. Toxicogenomics

A total of 12 male mice CD-1 strain (*Mus musculus*) (Charles River Laboratories International Inc. Hollister, CA, USA) with body weight of 25 ± 4 g and two month old, were provided by the School of Medicine of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The animals were kept under standard conditions (12 h light/dark and 27 ± 2 °C) in ventilated boxes and fed with RatChow™. Animals were divided in three groups according to the treatment: 1) Soulatrolide, 2) Mammea (A/BA + A/BB 3:1) and 3) Control. The treatments were orally administered for a whole week at a dose of 100 mg/kg/daily during a week for short term exposure accordingly to (Fielden et al., 2007). Compounds were dissolved in DMSO and diluted with water (5% v/v), control group received 0.9% isotonic saline solution (ISS). All animal work was directed in strict accordance with relevant national and international guidelines. The study protocol IG-2005-13 was approved by the Animal and Ethics Experiment Board of School of Medicine of the Universidad Nacional Autónoma de México. Mice liver was immediately obtained after euthanasia and then processed with the PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad Ca, USA) to obtain total RNA. The amount of RNA was determined by spectrophotometry using the Nanodrop®2000 device (ThermoScientific, Waltham MA, USA) and RNA integrity was evaluated by using a Bioanalyzer® (Agilent, Waldbronn, Germany). cDNA synthesis, target hybridization, probe array washing, staining and subsequent probe array scanning were done according to the standard protocol of the 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara Ca, USA). Microarray analysis was performed by using Affymetrix Mouse Gene Chip 1.0 Array, using three microarrays per treatment.

Table 1
¹H NMR and ¹³C NMR data for Mammea A/BA + A/BB (3:1) isolated from *C. brasiliense* (Fig. 2). Reference (Crombie et al., 1966; Reyes-Chilpa et al., 2004).

Mammea A/BA+A/BB (3:1)				
Position	Mammea A/BA		Mammea A/BB	
	¹ H* (J, Hz)	¹³ C**	¹ H* (J, Hz)	¹³ C**
C-2		158.6s		158.6s
C-3	5.99 (s, 1H)	112.1d	5.99 (s, 1H)	112.1d
C-4		154.2s		154.2s
C-4 a		100.5s		100.5s
C-5	5.94 (s, 1H)	157.1s	5.94 (s, 1H)	157.1s
C-6		112.6s		112.6s
C-7	14.6 (s, 1H)	166.9s	14.6 (s, 1H)	166.9s
C-8		104.3s		104.3s
C-8 a		155.7s		155.7s
C-1'		137s		137s
C-2'	7.42 (m, 2H)	127.5d	7.42 (m, 2H)	127.5d
C-3'		128d		128d
C-4'	7.56 (m, 3H)	130.3d	7.56 (m, 3H)	130.3d
C-5'	7.42 (m, 2H)	129.5d	7.42 (m, 2H)	129.5d
C-6'		127.5d		127.5d
C-1''	3.3 (d, J = 6 Hz, 2H)	21t	3.3 (d, J = 6 Hz, 2H)	21t
C-2''	5.10 (t, J = 6 Hz, 1H)	120.8d	5.10 (t, J = 6 Hz, 1H)	120.8d
C-3''		134s		134s
C-4''	1.7 (s, 3H)	17.8q	1.7 (s, 3H)	17.8q
C-5''	1.65 (s, 3H)	25.7q	1.65 (s, 3H)	25.7q
C-1'''		206.9s		210.5s
C-2'''	3.19 (d, J = 9 Hz, 2H)	53.6t	3.95 (m, 1H)	47.0d
C-3'''	2.32 (m, 1H)	25.7d	1.02 (t, J = 7.5 Hz, 3H)	16.6q
C-4'''	1.06 (d, J = 6.6 Hz, 3H)	22.7q	1.93 (m, 1H)	
1.50 (m, 1H)	27.2t			
C-5'''	1.06 (d, J = 6.6 Hz, 3H)	22.7q	1.29(d, J = 6.6, 3H)	11.8q

*300 MHz/CDCI₃; **75.4 MHz/CDCI₃.

2.2.3. Microarray experiments and data acquisition processing

Signal intensities from each array were analyzed using the Partek Genomic Suite 6.4 (Partek Inc. St. Louis, Missouri, USA). Raw intensity probe values were normalized using robust multiarray analysis background correction (RMA). A two way ANOVA was

Table 2
¹H NMR and ¹³C NMR data for Soulatrolide isolated from *C. brasiliense* (Fig. 2). Reference (Gunasekera et al., 1977).

Soulatrolide		
Position	¹ H* (J, Hz)	¹³ C**
C-2		160.6s
C-3	5.95 (s, 1H)	111.6d
C-4		156.2s
C-4a		103.0s
C-4b		151.1s
C-6		77.2s
C-7	5.36 (d, J = 9.7 Hz, 1H)	127.5d
C-8	6.53 (d, J = 9.7 Hz, 1H)	115.9d
C-8a		106.1s
C-8b		153.5s
C-10	4.28(d, J = 10.9,6.1 Hz, 1H)	73.0d
C-11	1.77(ddq, J = 10.9, 7.0, 3.3 Hz, 1H)	38.2d
C-12	5.03(d, J = 3.3, 1H)	61.7d
OH-12	2.50 (s, 1H)	
C-12a		106.0s
C-12b		153.7s
C-13		139.9s
C-14	7.36 (m, 2H)	127.3d
C-15	7.23 (m, 3H)	127.3d
C-16		127.2d
C-17		127.3d
C-18	7.36 (m, 2H)	127.3d
C-19	0.93 (s,3H)	26.8q
C-20	0.93 (s, 3H)	26.7q
C-21	1.43 (d, J = 6.1 Hz, 3H)	18.8q
C-22	1.16 (d, J = 7.0 Hz, 3H)	12.5q

*300 MHz/CDCI₃; **75.4 MHz/CDCI₃.

performed to identify differentially expressed genes (DEGs). Only genes with statistically significant differences in expression levels (p-value<0.05) and a fold change criteria of ≥ 1.5 and ≤ -1.5 were included in the final set of differentially expressed genes. The generated microarray data were deposited at Gene Expression Omnibus (GEO accession: **GSE72755**) and on Data Article (Gomez-Verjan et al., 2015).

2.2.4. Gene ontology (GO) analysis

The list of genes with significant changes on expression levels for both treatments were used as input lists for the DAVID Functional Annotation Clustering tool (Huang et al., 2008). This open source software provides an enrichment analysis of annotation and gene ontology (GO) terms based on GO Term Finder, which finds significant terms shared among a list of identifiers related with different biological process. The corrected p-value was obtained by applying Bonferroni correction (Huang et al., 2008). GO analysis was also performed by using the Comparative Toxicogenomics Database (CTD), which contains data about drug–disease interactions (Davis et al., 2011). The CTD poses a manually contains annotations of biological relations from various categories such as chemical-disease, gene disease, drug–gene associations along with the corresponding PubMed citation.

2.2.5. Network analysis (network directed strategy to toxicity prediction)

we defined a set of functional motifs suspected to be involved with drug induced hepatotoxicity, such as Apoptosis (ApoM); DNA damage (DNAd); Reference Genes (HCD-1); Mouse Necrosis (NeM); Oxidative Stress (O-S); Immuno toxicity (I-T) and a list of reference genes related to hepatotoxicity in CD-1 mouse (H-M) (Williams et al., 2004). The complete set of genes (that we named seeds) related to these functions is reported in Supplementary Material (Tables 1–8S).

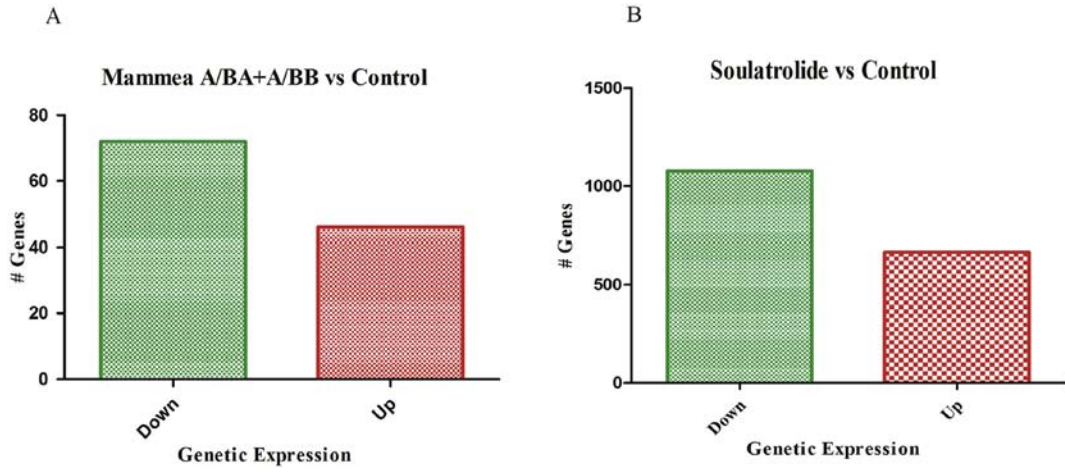


Fig. 3. Differentially expressed genes for each treatment (Fold Change >1.5 and <-1.5; p-Value <0.05). A) Mammea (A/BA + A/BB -3:1). B) Soutlatrolide vs Control.

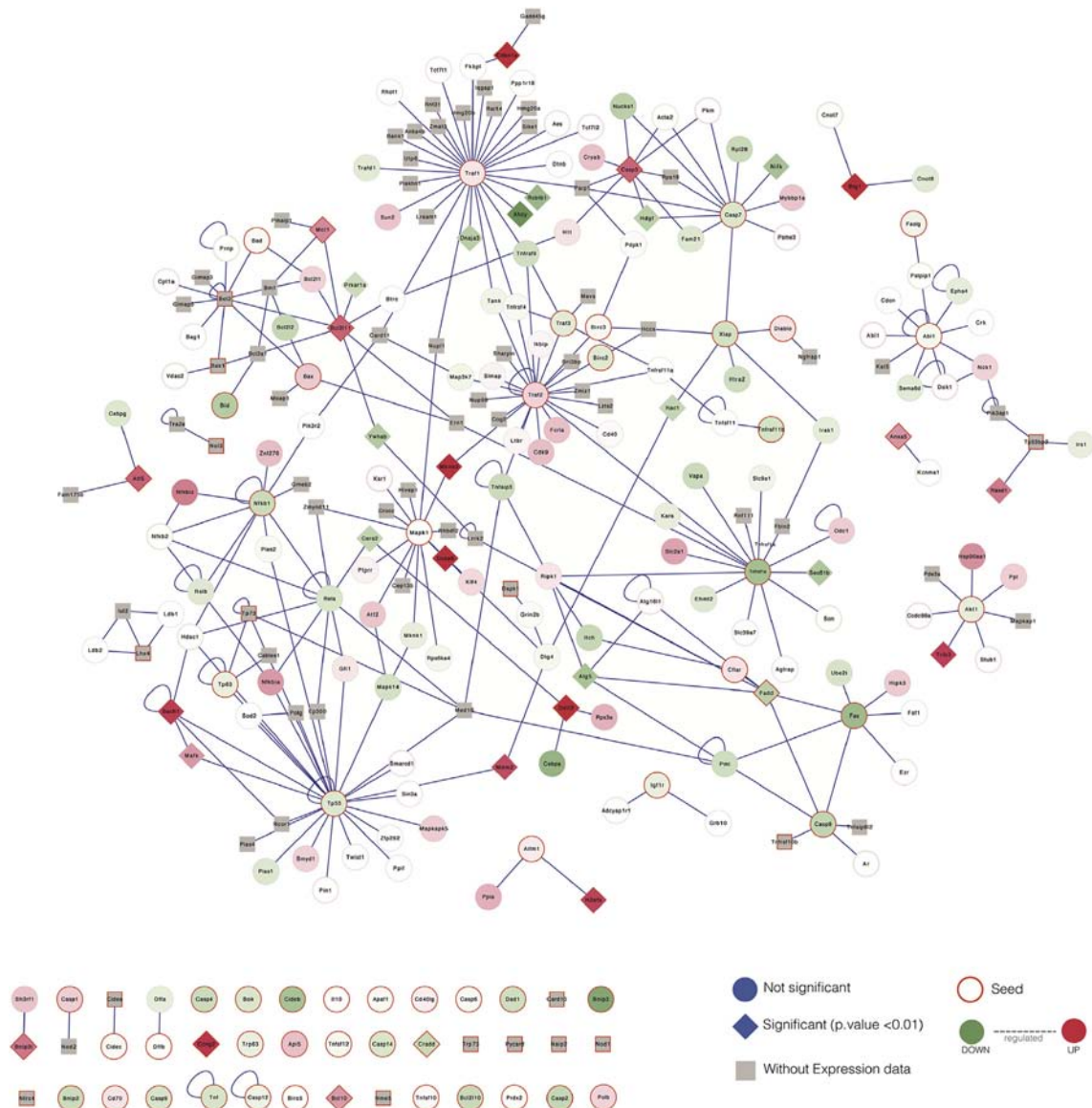


Fig. 4. Graphical representation of the positive reference network for apoptosis motif with protein–protein interactions (interactome) obtained from gene expression data for paracetamol intoxication taken from Williams et al., 2004.

Table 3
Pathways enriched in mouse liver by coumarins treatments (Soulatrolide: 1744 DEG's, Mameea A/BA + A/BB: 120 DEG's).

Treatment	Pathway	Count ¹	%C ²	P-value	ES
Mameea A/BA + A/BB (3:1)	Drug metabolism ^a	6	5	1.9E-4	4.57
	Metabolism of xenobiotics by CYP P450 ^a	5	4.2	1.3E-3	4.57
	Cytokine–cytokine receptor interaction ^a	6	5	3.1E-2	2.27
	Retinol metabolism ^a	6	5	1.2E-4	2.18
	Response to chemical ^b	27	22.5	4.2E-6	NA ³
	Cellular response to chemical stimulus ^b	23	19.2	1.13E-7	NA ³
Soulatrolide	Metabolism of xenobiotics by CYP P450 ^a	25	1.6	9.8E-9	4.87
	Retinol metabolism ^a	21	1.3	7.7E-6	4.87
	Glutathione metabolism ^a	15	1	5.0E-4	3.88
	Metabolic process ^b	770	50	5.05E-63	NA ³
	Organic Metabolic process ^b	688	44.6	6.44E-54	NA ³

¹Number of DEG's involved in the pathway. ²Percentage of the total number of annotated genes in the DEG's. ³Enrichment Score (ES) of each group is measured by the geometric mean of the modified Fisher Exact associated with the enriched annotation terms that belong to this gene group. ⁴Not reported by CTD.

^a KEGG pathways identified by DAVID.

^b GO-BP identified by CTD.

2.2.5.1. Network generation. to contextualize the “seed” genes in each functional networking motif, we generated a network with the direct interactors from our seeds (1st level-1PPI) and interactors of direct interactors (2nd level-2PPI). Physical interactions among proteins were collected from an integrated database containing PPI data from nine major public sources: Intact, MINT, DIP, MatrixDB, InnateDB, BioGRID, BIND, MPIDB and HPRD. A graphical representation of the networks generated using the previously mentioned databases is seen on Fig. 4, which contains the apoptosis motif for differential expressed genes of positive control Acetaminophen (APAP).

2.2.5.2. Gene set enrichment analysis (GSEA). for each motive related network (motive expanded by including the first and second interactors of the predefined seeds) we performed a functional enrichment analysis (Subramanian et al., 2005) with the objective of identifying the group of genes (motifs) significantly up or down regulated under different toxicological conditions (p-value < 0.01 for significance and fold change measures the direction of regulation).

In order to validate if our network motifs indicate toxicity in the liver after coumarins treatment, we use Arrayexpress GEO database to obtain toxicogenomic profiles in CD-1 mice of acetaminophen (APAP-Figure 4-Apoptosis motif) (Williams et al., 2004) and CCl₄ intoxication, as positive controls for network toxicity. We use the data obtained in such studies for APAP at 8 h and CCl₄ at 8 h. As negative control we use data obtained from Campos et al. (2014) of transcriptomic profile of 16 days after treatment with CCl₄.

2.3. Histology (liver, spleen and kidney)

Liver, Kidney and Spleen were fixed in phosphate-buffered 4% formalin (pH 7.4) for 24 h and then embedded in paraffin. Sections were cut into 5- μ m-thick slices and used for staining with routine hematoxylin-eosin (HE) (Feldman and Wolfe, 2014) and periodic acid-Schiff (PAS) stain (Herzog et al., 2007). The slides were analyzed and evaluated in a blinded fashion to the treatment by the pathologist, under a light microscope to assess general architecture and injury.

2.4. In situ detection of apoptosis

Liver apoptotic cells were detected *in situ* by TUNEL assay, following manufacturer's protocol (Roche Life Science, Mannheim, Germany). Briefly, liver sections were deparaffinized, rehydrated, and processed to identify TUNEL positive cells by visualizing the green fluorescence of fluorescein-12-dUTP and red fluorescence of propidium iodide under a Nikon microscope (Nikon Instruments

Inc. Melville, NY, USA) at >620 nm. A liver section pretreated with DNase I (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was used as positive control.

3. Results

3.1. C. brasiliense Hexane extracts and coumarins (Soulatrolide and Mameea A/BA + A/BB) display low toxicity in vivo

The hexane extracts of aerial parts of CT-1 and CT-2 specimens, as well as Soulatrolide and Mameea type coumarins mixture (A/BA + A/BB 3:1) did not lead to death after a week of any of the tested doses (10–2900 mg/kg) indicating a DL₅₀ > 3000 mg/kg; therefore, these substances are slightly toxic accordingly to Lorke assay classification (Lorke, 1983). Neither changes on behavior nor changes in main organs structure and weight were observed.

3.2. Liver toxicogenomic analysis did not identify a toxic associated transcriptomic profile after treatments with soulatrolide or mameea A/BA + A/BB

Mice were treated orally with 100 mg/kg of Mameea A/BA + A/BB (3:1) or Soulatrolide daily for one week in a short term exposure accordingly to most of mouse models concerning prediction of a hepatocarcinogenic potential (Currie, 2012; Fielden et al., 2007; Römer et al., 2014). After this time, total RNA was obtained as described in the Methods section and expression microarrays were used to detect differentially expressed genes. Mameea A/BA + A/BB treatments were associated with 46 upregulated genes and 72 downregulated genes, as compared to controls (Fig. 3A). In contrast, Soulatrolide treatments were associated with 665 upregulated genes and 1077 downregulated genes (Fig. 3B). Mameea A/BA + A/BB treatment induced 14 times less differential express genes than Soulatrolide treatment.

In order to identify the molecular pathways that could be affected by the treatments, gene enrichment analysis was performed by using DAVID and CTD functional annotation tools. Table 3 shows the main results for enrichment analysis in both databases. All the up or down regulated genes showed in Table 3 were enriched with a high Enrichment Score (ES) and a significant P-value.

Apoptosis related seeds are highlighted with orange node border. All their direct interactors are colored based on fold-change, in red up regulated genes, in green down regulated genes, grey and square nodes represent genes without genetical expression data. Diamond shape corresponds to significant genes (p < 0.01) and circles not significant genes.

Table 4

Network Enrichment Analysis of functional motifs generated for coumarins treatment. Mouse Apoptosis (ApoM); DNA damage (DNAd); Reference Genes (HCD-1); Mouse Hepatotoxicity (H-M); Mouse Necrosis (NeM); Oxidative Stress (O-S); Immuno toxicity (I-T). n = number of genes in the network. *Statistical significance enriched motives (*p < 0.05, **p < 0.01); upregulated (red) or down regulated genes (blue).

Treatment	Mammea A/BA+A/BB (3:1)								
Motives	n	p-value	Seed	n	p-value	1PPI	n	p-value	2PPI
ApoM	81			271			769		
DNAd	82			139	*	0.17	489		
HCD	69	**	-0.2	148			422		
H-M	101	**	-0.17	212			635		
NeM	79			198			713		
OS	77			132			300		
I-T	56	**	0.25	100			405		
Treatment	Soulatrolide								
Motives	n	p-value	Seed	n	p-value	1PPI	n	p-value	2PPI
ApoM	82			271			769		
DNAd	69			139			489		
HCD	101	*	-0.29	148			422		
H-M	79			212			635		
NeM	77			198			713		
OS	56			132			300		
I-T	81	*	-0.26	100	*	-0.2	405		

3.3. Network analysis of protein-protein-interaction for predictive screening of coumarins toxicity

As previously mentioned in Materials and Methods, we compiled a list of “seed” genes involved in several biological processes related to drug induced hepatotoxicity: ApoM; DNAd; HCD-1; H-M; NeM; O-S; I-T (Supplementary Material Tables 1–6S). In

addition, to contextualize them within the global cellular physiology, we constructed two protein–protein interaction networks (PPI) around them. We generated first-degree networks containing our seeds and their direct interactors (1PPI), and second-degree networks containing the direct interactors of our seeds direct interactors (2PPI). Moreover, we constructed the same 1PPI and 2PPI networks, adding as single nodes these seeds (1PPI and seeds

and 2PPI and seeds). The obtained network for the protein–protein interactions of all the differentially expressed genes related to the apoptosis motif for the positive control (APAP) in liver is seen on Fig. 4. The complete composition of each individual network corresponding to the other motifs is reported in Supplementary Data (Table 9S Expanded Motives GSEA).

We performed a GSEA for toxicological network motifs (seeds or PPI), in microarrays corresponding to treatments with coumarins and controls. GSEA plots for all motifs are shown in Supplementary Figures (1S–7S available online).

Network analyses of coumarins treatments (Table 4), revealed that in Mammea mixture only HCD, H-M and I-T motifs were significantly downregulated or upregulated at seed level, respectively. Also DNAd was slightly up regulated at 1PPI. On the other hand, Soulatrolide treatment showed HCD and I-T motifs significantly down regulated at seed level and 1PPI. The analysis performed with positive controls (APAP and CCl₄, 8 h) validated the network motifs, as predictors for toxicity, since they were found significant for seeds, 1PPI and 2PPI, with exception for NeM and I-T (Table 5). In contrast, negative control revealed that most of the motifs were not statistical significant, and HCD where upregulated

for seeds and H-M (downregulated on seeds, 1PPI and 2PPI). Taken together we found that both coumarins showed an enrichment profile similar to those of the negative hepatotoxic controls, none of coumarins treatments show an expanded network to 2PPI, such as shown by the positive controls.

3.4. Histological analysis of liver, spleen and kidney tissues in mice treated with soulatrolide or Mammea A/BA + A/BB coumarins did not detect tissue damage

The histomorphology of liver, spleen and kidney from animals treated with either Soulatrolide or Mammea A/BA + A/BB mixture was appraised in order to search for tissue damage. We did not find the common histopathology injury changes in any of the studied tissues by using HE and PAS stain techniques (Figs. 5 and 6), which confirms a safety profile. The following features of histopathology injury were sought: hepatocellular normal profile, canalicular cholestasis or ductular injury of the liver; lymphoid necrosis, vacuolization of splenic histocytes or atrophy of red and white pulp in the spleen; and glomerulonephritis, tubular cell toxicity or interstitial nephritis in the kidney. For a detailed histological

Table 5
Network Enrichment Analysis of functional motifs generated for reference controls. Mouse Apoptosis (ApoM); DNA damage (DNAd); Reference Genes (HCD-1); Mouse Hepatotoxicity (H-M); Mouse Necrosis (NeM); Oxidative Stress (O-S); Immuno toxicity (I-T). n = number of genes in the network. *Statistical significance enriched motives (*p < 0.05, **p < 0.01); upregulated (red) or down regulated genes (blue).

Positive control	APAP									
	Motives	n	p-value	Seed	n	p-value	1PPI	n	p-value	2PPI
	ApoM	81	**	0.62	271	**	0.5	769	**	0.42
	DNAd	82	**	0.7	139	**	0.6	489	**	0.4
	HCD	69	**	0.91	148	**	0.86	422	**	0.75
	H-M	101	**	0.79	212	**	0.72	635	**	0.56
	NeM	79			198			713		
	OS	77	**	0.84	132	**	0.75	300	**	0.64
	I-T	56	*	0.62	100	*	0.55	405	*	0.39
Positive control	CCl ₄ -8h									
	Motives	n	p-	Seed	n	p-	1PP	n	p-	2PPI

(continued on next page)

		value			value			value	
ApoM	81			271	**	0.43	769	**	0.39
DNAd	82	*	0.44	139			489	**	0.36
HCD	69	**	0.75	148	**	0.63	422	**	0.48
H-M	101	**	0.51	212	**	0.44	635	**	0.38
NeM	79			198	**	0.42	713	**	0.38
OS	77	**	0.7	132	**	0.6	300	**	0.48
I-T	56			100			405		
Negative control	CCl₄-16d								
Motives	n	p-value	Seed	n	p-value	1PPI	n	p-value	2PPI
ApoM	81			271			769		
DNAd	82			139			489		
HCD	69	*	0.36	148			422		
H-M	101	**	-0.38	212	**	-0.34	635	**	-0.3
NeM	79			198			713	*	-0.24
OS	77			132			300		
I-T	56			100			405		

description, see Supplementary Data. Moreover, no TUNEL positive cells were observed in the liver of treated mice, indicating a lack of apoptosis induction by any of treatments (Fig. 7).

4. Discussion

Although there is an increase on the development of new active

compounds with promising therapeutical properties, toxicity is still one of the main reasons for drugs withdrawal from clinics, in particular, hepatotoxicity is one of the most common adverse effects induced by new developed active molecules (Chen et al., 2014). Therefore, in the present study, we evaluated the toxicological and hepatotoxic potential induced by coumarins: Mammea A/BA + A/BB mixture and Soulatrolide in a short term exposure

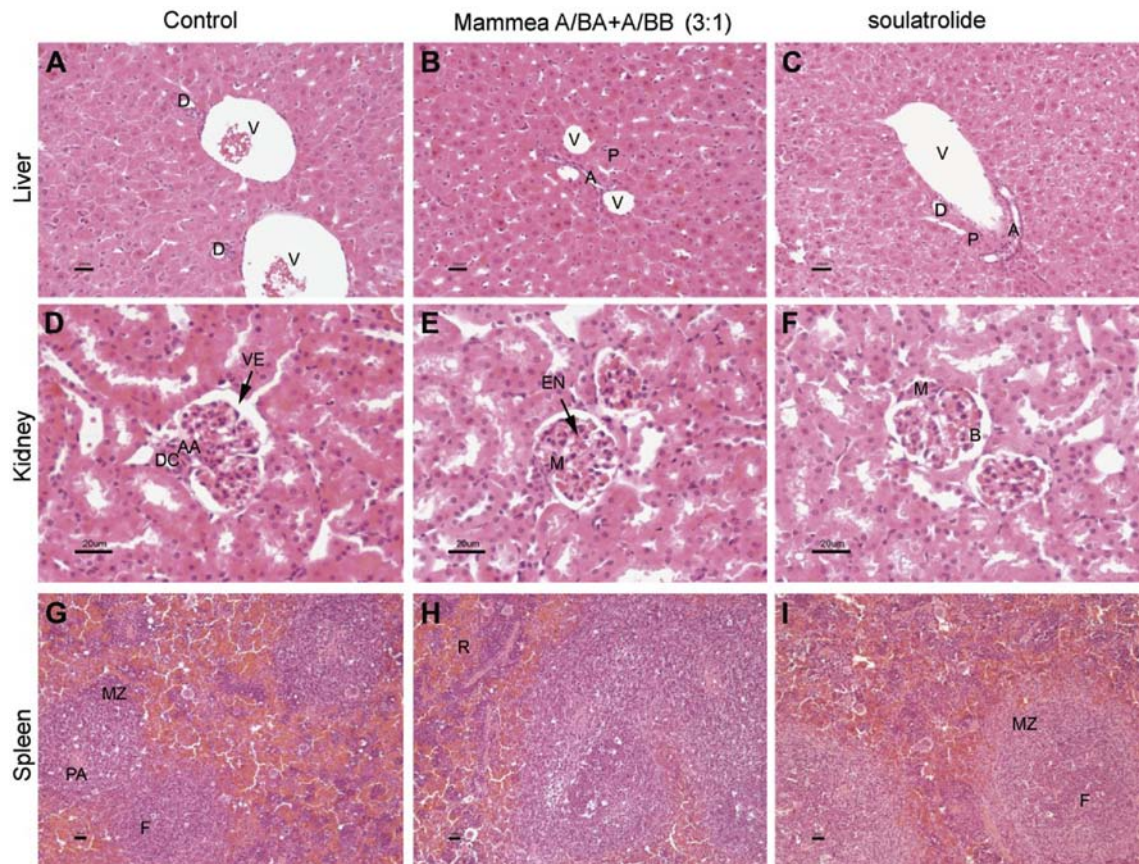


Fig. 5. Histopathology of treatments HE. Control (SSI) A,D,G. Mammea A/BA + A/BB 3:1 treatment (20 mg/Kg , daily) B,E,H. Soulatrolide (20 mg/Kg , daily) C,F,I. Liver: portal areas (P) were conserved without changes at the branches the portal vein (V), hepatic artery (A) or bile duct (D). The presence of portal areas along with central venules (CV) and liver cells arranged in plates were not altered. Kidney morphology of the glomerular features were evaluated and no changes were observed: conserved overall cellularity, symmetry and thickness of the capillary wall, the epithelial cells, endothelial cells (EN) and mesangial (M) cells had normal cytological features. The podocytes were stain forming the visceral epithelial surface (VE). Bowman's space (B) along with perietalepithelial cells (PE), the tubules (T) and the basement membranes were entire. The architecture of the spleen was not altered the red (R) and white (W) pulp were conserved. The white pulp was subdivided into the periarteriolar (PA) lymphoid sheath, the follicles (F) and the marginal zone (MZ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

study (Currie, 2012; Fielden et al., 2007; Römer et al., 2014). These compounds represent a promising alternative and source for new drug development. Soulatrolide against HIV-1, *M. tuberculosis* and Mammea A/BA + A/BB as cytotoxic compounds against leukemia, and antiparasitic infections specially *T. cruzi* and *L. amazonensis* (Abe et al., 2005; Brenzan et al., 2008; Gomez-Verjan et al., 2014; Huerta-Reyes et al., 2004; Ito et al., 2006; Pires et al., 2014).

Lorke assay, which is the main assay and first approach to test *in vivo* toxicity, revealed that Mammea A/BA + A/BB and Soulatrolide fall in the category of slightly toxic, since higher doses of both coumarins are necessary to induce death in mice ($DL_{50} > 3000$ mg/Kg, p.o.). These results highlight the safety of both types of coumarins when administered acutely in mice.

In addition to classic toxicology, toxicogenomics have emerged as a next-generation tool for drug discovery and development (Khan et al., 2014). In fact, it has been demonstrated that specific gene expression profiles observed after exposition of a model organism to a particular chemical compound, are associated with its underlying biological mechanism of action. Therefore, it has been suggested that specific gene expression profiles can be used to predict drug toxicity (Gusenleitner et al., 2014). Several studies highlight liver transcription profile as a valuable tool for toxicological prediction (Fielden et al., 2007; Gusenleitner et al., 2014; Nie et al., 2006; Waters et al., 2010). Consequently, in the present paper we have also applied a hepatic gene expression-based approach

analysis in a short term exposure study (Currie, 2012; Fielden et al., 2007; Römer et al., 2014) with mice to identify chemical-induced mRNA transcripts, since most of these, are predictive of, and mechanistically linked, to long-term liver damage (Fielden et al., 2007).

Interestingly, Soulatrolide induced a major number of DEG's than Mammea A/BA + A/BB (Fig. 3). These differences in the gene expression profile could be due to chemical structural complexity between both type of coumarins (Fig. 2), as reported by Kleiner et al. (2001). According to these authors, highly complex coumarins apparently confer a P450 modulating activity in a structural related manner, leading also to over expression of transcription factors, and other proteins responsible for drug transport; on the other hand, simple coumarins that did not seem to have effects over Phase I and Phase II reactions of drug metabolism (Kleiner et al., 2008). In fact, our results indicate that DEG's of Soulatrolide were mostly significantly enriched for drug metabolism pathways, mainly through CYP P450, in contrast to Mammea coumarins, where fewer changes in transcriptomic profile were observed. Nevertheless, further studies are required to establish the toxicological risks of Soulatrolide since this compound affected the gene expression of a number of transcripts related to drug metabolism in the liver that could affect the detoxification pathways after long time exposure.

As part of the bioinformatic analysis we used a systems toxicological approach (Waters and Fostel, 2004) through the use of

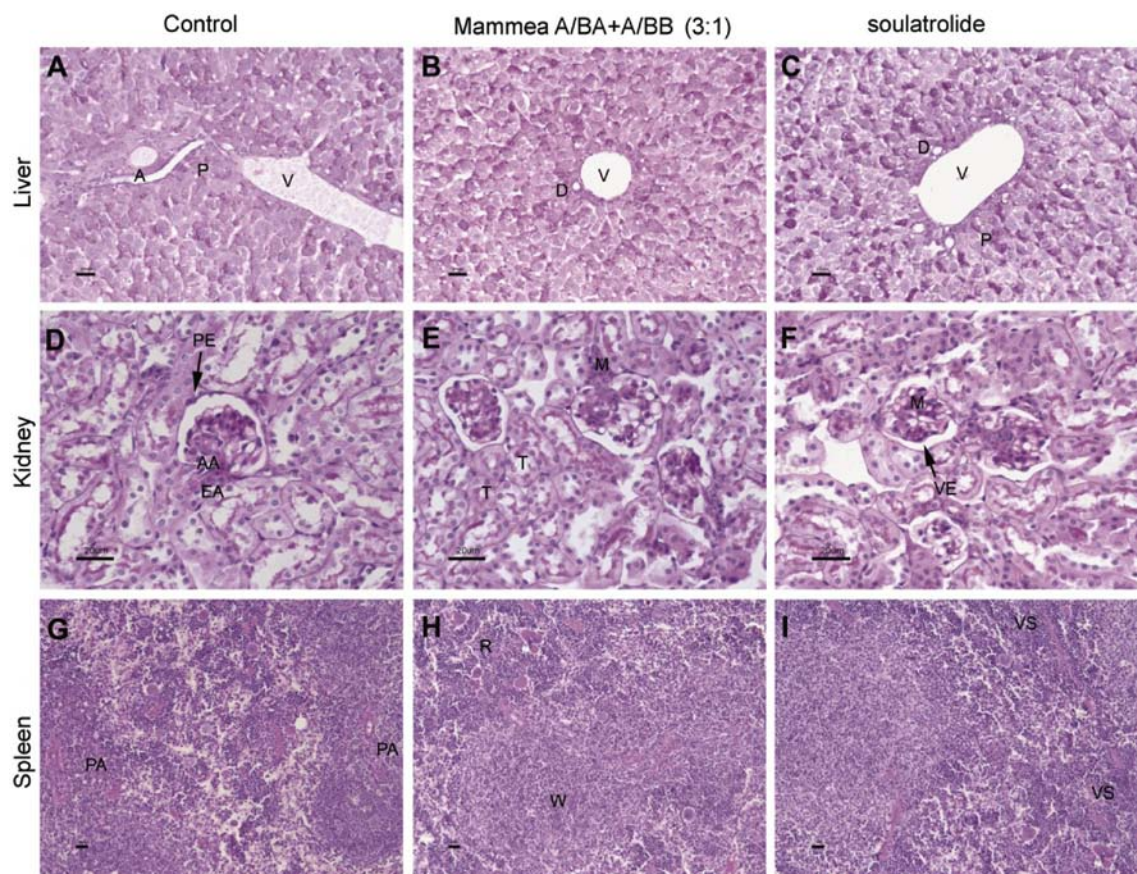


Fig. 6. PAS staining Histomorphology analysis of treatments. Control (SSI) A,D,G. Mammea A/BA + A/BB 3:1 treatment (20 mg/Kg, daily) B,E,H. Soulatrolide (20 mg/Kg, daily) C,F,I. Liver: Portal areas (P) were conserved without changes at the branches of the portal vein (V), hepatic artery (A) or bile duct (D). The portal areas along with central venules (CV) and liver cells arranged in plates were not altered. Kidney: the glomerular features were evaluated and no changes were observed: conserved overall cellularity, symmetry and thickness of the capillary wall. The endothelial cells (EN), mesangial(M) cells. The podocytes were stain forming the visceral epithelial surface (VE), Bowman's space (B) along with perietal epithelial cells (PE), the tubules (T) and the basement membranes had normal cytological features. Spleen: the red (R) and white (W) pulp was conserved. W was subdivided in the periaarteriolar (PA) lymphoid sheath, the follicles (F) and the marginal zone (MZ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

PPI, with a directed network approach for hepatotoxicity prediction. Network enrichment analyses of specifically defined network motifs for different hepatotoxic processes (Table 3)

revealed that for both type of coumarins there are few motifs significantly downregulated or upregulated at the seed level or 1PPI level, as compared with the positive controls (CCl₄ and APAP)

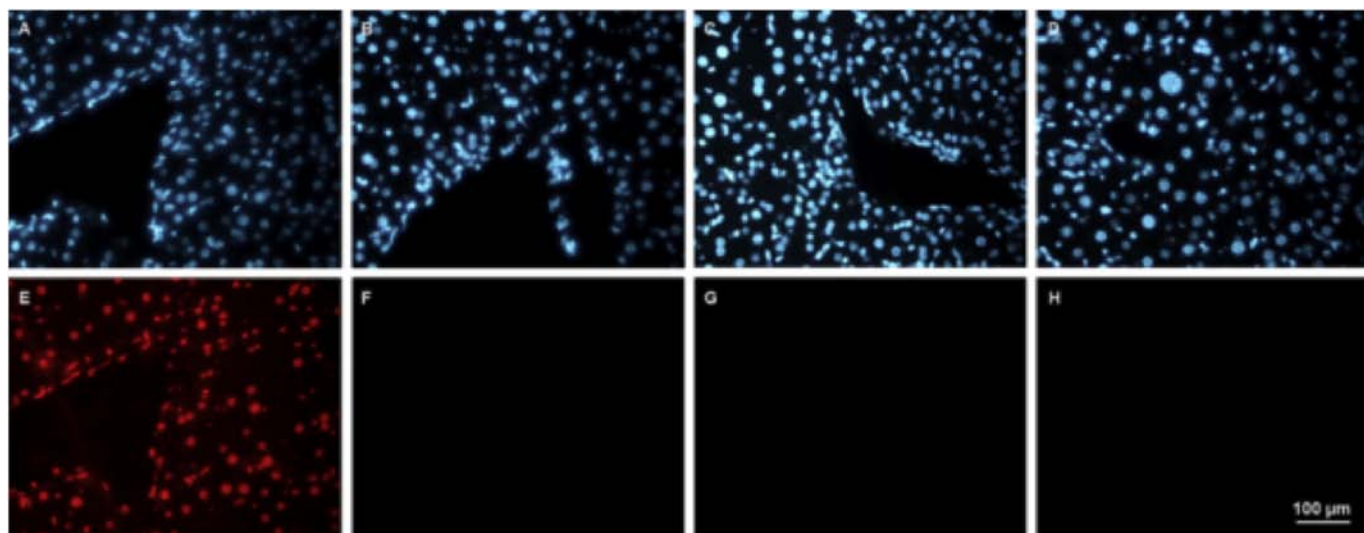


Fig. 7. TUNEL assay from liver tissue of the different treatments. DAPI A-D, TUNEL E-H. Positive Control (A, E) Mammea A/BA + A/BB 3:1 treatment (B, F) Soulatrolide treatment (C, G) Negative Control (D, H).

which were significantly enriched for almost all the seed, 1PPI and 2PPI corresponding motifs. These results strongly suggest that the transcription toxicological profile of both types of coumarins is associated with a safety profile in liver mice. However, mRNA is subjected to many post-transcriptional processes affecting the total levels of the corresponding protein, and this is also subjected to post-translational processes that influence their content; therefore, it is necessary to analyze the functional effects that are exerted by the whole proteins that in turn direct a particular biological process (Hegde et al., 2003). In order to determine the functional effects of soulatrolide and Mammee A/BA + A/BB treatments, several mice tissues were analyzed by histological approaches (Figs. 5 and 6), and by TUNEL assay in liver of mice (Fig. 7). The results from these assays were in accordance to the toxicogenomic analysis, we did not find any sign of tissue damage in liver, kidney and spleen of mice by HE and PAS staining, suggesting that both coumarins are non-toxic to organs generally affected by drugs, furthermore, none of the compounds induced apoptosis in mice liver by TUNEL. In general, network analysis revealed that most of the enriched pathways were associated with drug metabolism and interestingly, did not show a correlation between common affected pathways in liver injury induced by drugs, which was confirmed by the absence of liver damage as assessed by histological approaches. The advantage of analyzing the expression profiles, in light of defined pathophysiological processes, is that being specifically tailored to study drug induced hepatotoxicity, a significant enrichment or depletion of any of the associated motifs is much easier to interpret from a biological perspective than the more abstract gene ontology terms (Casas et al., 2015).

In conclusion, our results represent an important step in the drug development process and safety profile assessment of Soulatrolide and Mammee A/BA + A/BB coumarins. In particular, we have demonstrated that treatments with both types of coumarins display a safety profile as demonstrated by toxicogenomic and classical toxicological approaches, thus supporting their potential use in further preclinical and clinical studies. Furthermore, this study strengthens the potential use of Mammee A/BA + A/BB against several diseases, as these type of coumarins possess physicochemical properties consistent with drug leads (Gomez-Verjan et al., 2014). In addition these compounds can be easily obtained with good yields from the aerial parts of *C. brasiliense* in sustainable forest plantations (Tapia and Reyes-Chilpa, 2008) or by chemical synthesis (Defant et al., 2015; Sekino et al., 2004). On the other hand, our results demonstrate the importance of toxicogenomics in the search for new models to obtain faster and accurate results for its eventual introduction for drug development process as standard procedures (Amir-Aslani, 2008; Gusenleitner et al., 2014; Nie et al., 2006; Theodosiou et al., 2013). We will further study the effects of chronic treatments and higher doses of both types of coumarins in order to compare these treatments with the present results.

Acknowledgments

Juan Carlos Gomez Verjan is grateful with CONACYT for providing a scholarship 220346. This work was submitted in fulfillment of the requirements to obtain PhD degree at Doctorado en Ciencias Biomédicas from UNAM. This research was supported by grant IG200513 from DGAPA, UNAM. Ignacio Gonzalez-Sanchez was supported by a post-doctoral grant (DGAPA, UNAM). This research was supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, USA (D M-V). We are grateful with Jorge Ivan Castillo-Arellano, Iliana Arellano-Bermudez, and Laura Guzmán-Gutiérrez, for botanicals collects, and laboratory

assistance. We also thank Rocio Patiño, Hector Ríos, Beatriz Quiroz, Maria de los Angeles Peña, Javier Pérez, and Luis Velasco for spectrometric recordings of tested compounds.

Juan Carlos Gomez Verjan es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca 220346 de CONACYT. El presente trabajo se presentó en cumplimiento de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.010>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.010>.

References

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., 2002. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1188–1191. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.25.1188>.
- Abe, F., Nagafuji, S., Okawa, M., Kinjo, J., Akahane, H., Ogura, T., Martínez-Alfaro, M.A., Reyes-Chilpa, R., 2005. Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1314–1317. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.28.1314>.
- Amir-Aslani, A., 2008. Toxicogenomic predictive modeling: emerging opportunities for more efficient drug discovery and development. *Technol. Forecast. Soc. Change* 75, 905–932. <http://dx.doi.org/10.1016/j.techfore.2007.10.002>.
- Arrowsmith, J., 2011. Trial watch: phase II failures: 2008–2010. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 328–329.
- Brenzan, M.A., Nakamura, C., Prado Dias Filho, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M., Aparicio Garcia Cortez, D., 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 101, 715–722. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0542-7>.
- Brenzan, M.A., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Ueda-Nakamura, T., Young, M.C.M., Correa, A.G., Alvim, J., dos Santos, A.O., Cortez, D.A.G., 2008. Structure-activity relationship of (-) mammee A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Biomed. Pharmacother.* 62, 651–658. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2008.08.024>.
- Brenzan, M.A., Santos, A.O., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., Ueda-Nakamura, T., Young, M.C.M., Correa, A.G., Júnior, J.A., Morgado-Díaz, J.A., Cortez, D.A.G., 2012. Effects of (-) mammee A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine* 19 (3–4), 223–230.
- Butler, M.S., 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22 (2), 162–195.
- Butler, M.S., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., 2014. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1612–1661. <http://dx.doi.org/10.1039/C4NP00064A>.
- Campos, G., Schmidt-Heck, W., Ghallab, A., Rochlitz, K., Pütter, L., Medinas, D.B., Hetz, C., Widera, A., Cadenas, C., Begher-Tibbe, B., Reif, R., Günther, G., Sachinidis, A., Hengstler, J.G., Godoy, P., 2014. The transcription factor CHOP, a central component of the transcriptional regulatory network induced upon CCl4 intoxication in mouse liver, is not a critical mediator of hepatotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 1267–1280. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-014-1240-8>.
- Casas, C., Isus, L., Herrando-Grabulosa, M., Mancuso, F.M., Borrás, E., Sabidó, E., Forés, J., Aloy, P., 2015. Network-based proteomic approaches reveal the neurodegenerative, neuroprotective and pain-related mechanisms involved after retrograde axonal damage. *Sci. Rep.* 5 art. no. 9185.
- Cechinel Filho, V., Meyre-Silva, C., Niero, R., 2009. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chem. Biodivers.* 6, 313–327.
- Chen, M., Bisgin, H., Tong, L., Hong, H., Fang, H., Borlak, J., Tong, W., 2014. Toward predictive models for drug-induced liver injury in humans: are we there yet? *Biomark. Med.* 8, 201–213. <http://dx.doi.org/10.2217/bmm.13.146>.
- Creagh, T., Ruckle, J.L., Tolbert, D.T., Giltner, J., Eiznhamer, D.A., Dutta, B., Flavin, M.T., Xu, Z.-Q., 2001. Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide a, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1379–1386. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.45.5.1379-1386.2001>.
- Crombie, L., Games, D.E., McCormick, A., 1966. Isolation and structure of mammee

- A/BA, A/AB and A/BB: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *L. Tetraedron* Lett. 7, 145–149. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)70204-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)70204-8).
- Currie, R.A., 2012. Toxicogenomics: the challenges and opportunities to identify biomarkers, signatures and thresholds to support mode-of-action. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 97–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.03.002>.
- Davis, A.P., King, B.L., Mockus, S., Murphy, C.G., Saraceni-Richards, C., Rosenstein, M., Wiegers, T., Mattingly, C.J., 2011. The comparative toxicogenomics database: update 2011. *Nucleic Acids Res.* 39, D1067–D1072. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq813>.
- Defant, A., Mancini, I., Tomazzoli, R., Balzarini, J., 2015. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 2H-pyran-2-one derivatives as potential HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Arch. Pharm. Weinh.* 348, 23–33. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201400235>.
- Do Carmo Souza, M., Beserra, A.M.S., Martins, D.C., Real, V.V., dos Santos, R.A.N., Rao, V.S., da Silva, R.M., de Oliveira Martins, D.T., 2009. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *J. Ethnopharmacol.* 123, 452–458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.030>.
- Feldman, A., Wolfe, D., 2014. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. In: Day, C.E. (Ed.), *Histopathology SE-3, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, pp. 31–43. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3.
- Fielden, M.R., Brennan, R., Gollub, J., 2007. A gene expression biomarker provides early prediction and mechanistic assessment of hepatic tumor induction by nongenotoxic chemicals. *Toxicol. Sci.* 99, 90–100. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm156>.
- García-Zebadúa, J.C., Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M., Castillo-Arellano, J.I., Santillán-Hernández, S., Vázquez-Astudillo, B., Mendoza-Espinoza, J.A., 2014. El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: Una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae* 21, 126–145.
- Gasparotto Jr., Arquimedes, Brenzan, Mislaïne Adriana, 2005. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade mucosídica do *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Quim. Nov.* 28, 575–578.
- Gomez-Verjan, J.C., Estrella-Parra, E.A., González-Sánchez, I., Vázquez-Martínez, E.R., Vergara-Castañeda, E., Cerbón, M.A., Reyes-Chilpa, R., 2014. Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 1189–1195. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12245>.
- Gómez-Verjan, J., Gonzalez-Sanchez, I., Estrella-Parra, E., Reyes-Chilpa, R., 2015. Trends in the chemical and pharmacological research on the tropical trees *Calophyllum brasiliense* and *Calophyllum inophyllum*, a global context. *Scientometrics* 1–12. <http://dx.doi.org/10.1007/s11192-015-1715-2>.
- Gomez-Verjan, J.C., Estrella-Parra, E.A., Gonzalez-Sanchez, I., Rivero-Segura, N.A., Vazquez-Martinez, R., Magos-Guerrero, G., Mendoza-Villanueva, D., Cerbón-Cervantes, M.A., Reyes-Chilpa, R., 2015. Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Genomics Data* 6, 258–259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2015.10.006>.
- Gunasekera, S.P., Jayatilake, G.S., Selliah, S.S., Sultanbawa, M.U.S., 1977. Chemical investigation of ceylonese plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium* Thw. and *Calophyllum soulattri* Burm. f. (Guttiferae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 1505–1511. <http://dx.doi.org/10.1039/P19770001505>.
- Gusenleitner, D., Auerbach, S.S., Melia, T., Gómez, H.F., Sherr, D.H., Monti, S., 2014. Genomic models of short-term exposure accurately predict long-term chemical carcinogenicity and identify putative mechanisms of action. *PLoS One* 9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102579>.
- Hegde, P.S., White, I.R., Debouck, C., 2003. Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 647–651. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.006>.
- Herzog, C., Seth, R., Shah, S.V., Kaushal, G.P., 2007. Role of meprin A in renal tubular epithelial cell injury. *Kidney Int.* 71, 1009–1018.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2008. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M.D.C., Abe, F., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R., 2004. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1471–1475. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.27.1471>.
- Ito, C., Murata, T., Itoigawa, M., Nakao, K., Kaneda, N., Furukawa, H., 2006. Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 975–980.
- Kashman, Y., Gustafson, K.R., Fuller, R.W., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Currens, M.J., Buckheit, R.W., Hughes, S.H., Cragg, G.M., Boyd, M.R., 1992. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.* 35, 2735–2743. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00093a004>.
- Khan, S.R., Baghdasarian, A., Fahlman, R.P., Michail, K., Siraki, A.G., 2014. Current status and future prospects of toxicogenomics in drug discovery. *Drug Discov. Today* 19, 562–578. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.001>.
- Kleiner, H.E., Vulimiri, S.V., Miller, L., Johnson, W.H., Whitman, C.P., DiGiovanni, J., 2001. Oral administration of naturally occurring coumarins leads to altered phase I and II enzyme activities and reduced DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons in various tissues of SENCAR mice. *Carcinogenesis* 22, 73–82. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/22.1.73>.
- Kleiner, H.E., Xia, X., Sonoda, J., Zhang, J., Pontius, E., Abey, J., Evans, R.M., Moore, D.D., DiGiovanni, J., 2008. Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 337–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.07.004>.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54, 275–287.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335. <http://dx.doi.org/10.1021/np200906s>.
- Nie, A.Y., McMillian, M., Brandon Parker, J., Leone, A., Bryant, S., Yieh, L., Bittner, A., Nelson, J., Carmen, A., Wan, J., Lord, P.G., 2006. Predictive toxicogenomics approaches reveal underlying molecular mechanisms of nongenotoxic carcinogenicity. *Mol. Carcinog.* 45, 914–933. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.20205>.
- Pengsuparp, T., Serit, M., Hughes, S.H., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., 1996. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mediated by soulatrolide, a coumarin isolated from the latex of *Calophyllum teysmannii*. *J. Nat. Prod.* 59, 839–842. <http://dx.doi.org/10.1021/np960399y>.
- Pires, C.T.A.T., Brenzan, M.A.A., Scodro, R.B. de L.B., Cortez, D.A.G.A., Lopes, L.D.G.D., Siqueira, V.L.D.L., Cardoso, R.F.F., 2014. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 324–329.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñoz, E., Apan, T.R.R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C.K., Vázquez-Torres, M., 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci.* 75, 1635–1647.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñoz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., Hernández-Ortega, S., 2008. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 431–436. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000500004>.
- Römer, M., Eichner, J., Metzger, U., Templin, M.F., Plummer, S., Ellinger-Ziegelbauer, H., Zell, A., 2014. Cross-platform toxicogenomics for the prediction of non-genotoxic hepatocarcinogenesis in rat. *PLoS One* 9, e97640. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097640>.
- Ruiz-Marcial, C., Reyes Chilpa, R., Estrada, E., Reyes-Esparza, J., Fariña, G.G.G., Rodríguez-Fragoso, L., 2007. Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 719–725.
- Sekino, E., Kumamoto, T., Tanaka, T., Ikeda, T., Ishikawa, T., 2004. Concise synthesis of anti-HIV-1 active (+)-inophyllum B and (+)-calanolide A by application of (–)-quinine-catalyzed intramolecular oxo-michael addition. *J. Org. Chem.* 69, 2760–2767. <http://dx.doi.org/10.1021/jo035753t>.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.
- Tapia Tapia, E.C., Reyes Chilpa, R., 2008. Productos forestales no maderables en México: aspectos económicos para el desarrollo sustentable Mexican non-wood forest products: economic aspects for sustainable development. *Maderas Bosques* 14, 95–112.
- Theodosiou, M., Amir-Aslani, A., Mégarbane, B., 2013. Emerging technologies and challenges for better and safer drugs. *Biotechnol. Lett.* 36, 677–684. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-013-1408-y>.
- Waters, M.D., Fostel, J.M., 2004. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat. Rev. Genet.* 5, 936–948. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1493>.
- Waters, M.D., Jackson, M., Lea, I., 2010. Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and toxicogenomics methods. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 705, 184–200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrr.2010.04.005>.
- Williams, D.P., Garcia-Allan, C., Hanton, G., LeNet, J.L., Provost, J.P., Brain, P., Walsh, R., Johnston, G.L., Smith, D.A., Park, B.K., 2004. Time course toxicogenomic profiles in CD-1 mice after nontoxic and nonlethal hepatotoxic paracetamol administration. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1551–1561. <http://dx.doi.org/10.1021/tx049846x>.
- Williams, D.P., Garcia Allan, C., Hanton, G., Le Net, J.L., Provost, J.P., Brain, P., Johnston, G.L., S.G.A., P.B.K., 2004. Chemical profiles. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1551–1561.
- Xu, Z.-Q., Barrow, W.W., Suling, W.J., Westbrook, L., Barrow, E., Lin, Y.-M., Flavin, M.T., 2004. Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1199–1207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2003.11.012>.
- Zavaleta-Mancera, H., Reyes-Chilpa, R., García-Zebadúa, J., 2011. Leaf structure of two chemotypes of *Calophyllum brasiliense* from Mexico. *Microsc. Microanal.* 17, 340–341. <http://dx.doi.org/10.1017/S1341927611002571>.



Data in Brief

Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*

J.C. Gomez-Verjan^a, E.A. Estrella-Parra^a, I. Gonzalez-Sanchez^a, N.A. Rivero-Segura^b, R. Vazquez-Martinez^b, G. Magos-Guerrero^c, D. Mendoza-Villanueva^d, M.A. Cerbón-Cervantes^b, R. Reyes-Chilpa^{a,*}

^a Instituto de Química, UNAM, Mexico City, Mexico

^b Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM, Mexico City, Mexico

^c Lab. Fitofarmacología, Depto. de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM; México City, Mexico

^d Laboratory of Cell and Developmental Signaling, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, U.S.A.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2015

Accepted 13 October 2015

Available online 23 October 2015

ABSTRACT

Calophyllum brasiliense (Calophyllaceae) is a tropical rain forest tree, mainly distributed in South and Central America. It is an important source of bioactive natural products like, for instance soulatrolide, and mammea type coumarins. Soulatrolide is a tetracyclic dipyrano coumarins and a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase and *Mycobacterium tuberculosis*. Mammea A/BA and A/BB coumarins, pure or as a mixture, are highly active against several leukemia cell lines, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. In the present work, a toxicogenomic analysis of Soulatrolide and Mammea A/BA + A/BB (3:1) mixture was performed in order to validate the toxicological potential of this type of compounds. Soulatrolide or mixture of mammea A/BA + A/BB (3:1) was administered orally to male mice (CD-1) at dose of 100 mg/kg/daily, for 1 week. After this time, mice were sacrificed, and RNA extracted from the liver of treated animals. Transcriptomic analysis was performed using Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array. Robust microarray analysis (RMA) and two way ANOVA test revealed for mammea mixture treatment 46 genes upregulated and 72 downregulated genes; meanwhile, for soulatrolide 665 were upregulated and 1077 downregulated genes. Enrichment analysis for such genes revealed that in both type of treatments genetic expression were mainly involved in drug metabolism. Overall results indicate a safety profile. The microarray data complies with MIAME guidelines and are deposited in GEO under accession number [GSE72755](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72755).

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Specifications	
Subject area	Chemistry
More specific subject area	Natural Products–Toxicogenomics
Organism/cell line/tissue	CD-1 mice
Sex	Male
Sequencer or array type	Affymetrix mouse gene chip 1.0 Array
Data format	Raw and Analyzed with RMA and two way ANOVA
Experimental factors	Comparison of control (SSI) and treatment (100 mg/Kg) with soulatrolide or mammea A/BA + A/BB (3:1) mixture
Experimental features	RNA was extracted from the liver of mice after 1 week of treatment, converted to cDNA and hybridized to Affymetrix arrays

(continued)

Specifications	
Consent	All animal work was conducted in strict accordance with relevant national and international guidelines. The study protocol IG-2005-13 was approved by the Animal and Ethics Experiment Board of School of Medicine of Universidad Nacional Autónoma de México
Sample source location	Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico City, Mexico.

1. Direct link to deposited data

The data is deposited in GEO under accession number [GSE72755](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72755): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72755>.

2. Value of the data

- The data provide a toxicogenomics signature of two types of pharmacological active coumarins that could be for comparison in other studies of this kind.

* Corresponding author.

E-mail addresses: carlosverjan@comunidad.unam.mx (J.C. Gomez-Verjan), chilpa@unam.mx (R. Reyes-Chilpa).

Table 1

Analysis of pathways enriched by coumarins treatments (Soulatrolide 1744 DEG's and Mammee A/BA + A/BB-120 DEG's).

Treatment/genes	Pathway	P-Value	Count
Mammee A/BA + A/BB (3:1) Down Regulated Genes (Fold Change >1.5 < -1.5; p-value <0.05).	KEGG_PATHWAY: 00830 Retinol metabolism	4.96E-5	8
	KEGG_PATHWAY: 00982 Drug metabolism	0.00103	5
Mammee A/BA + A/BB (3:1) Up regulated genes (fold change >1.5 < -1.5; P-VALUE <0.05).	KEGG_PATHWAY 04060:Cytokine–cytokine receptor interaction	0.005272	4
	KEGG_PATHWAY 00980:Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3.36E-11	34
Soulatrolide Down regulated genes (fold change >1.5 < -1.5; p-value <0.05).	KEGG_PATHWAY 00982:Drug metabolism	4.94E-10	38
	KEGG_PATHWAY 00830:Retinol metabolism	2.36E-8	52
Soulatrolide Up regulated genes (Fold change >1.5 < -1.5; p-value <0.05).	KEGG_PATHWAY 00980:Metabolism of xenobiotics by CYP P450	3.359E-11	34
	KEGG_PATHWAY 00982:Drug metabolism	4.94E-10	38
	KEGG_PATHWAY 00830:Retinol metabolism	2.36E-8	52

- The data provide an insight in the metabolism induced by pharmacological active coumarins.
- This data provides the first toxicogenomic analysis on mammea type coumarins particularly mammea A/BA and A/BB, and on tetracyclic coumarins such as soulatrolide.

3. Experimental design, materials and methods

3.1. Toxicogenomics assay

A total of 12 male mice (*Mus musculus*) strain CD1 (Charles River), body weight 25 ± 4 g, with an age of two month old, were provided by the School of Medicine of the National University of Mexico (UNAM). The animals were kept under standard conditions in ventilated boxes (12 h light/dark and 27 ± 2 °C) and fed with RatChow™ divided in three groups depending on treatments: 1)Soulatrolide, 2)Mammea (A/BA + A/BB 3:1) and 3) Isotonic Saline Solution 0.9% (control). Treatments were administered orally for 7 days at a dose of 100 mg/Kg/daily [1]. All animal work was conducted in strict accordance with relevant national and international guidelines. The study protocol IG-2005-13 was approved by the Animal and Ethics Experiment Board of School of Medicine of Universidad Nacional Autónoma de México. Liver of animals was immediately obtained after sacrificed and samples immediately homogenized with PureLink® RNA Mini Kit. The amount of RNA was determined by using Nanodrop®2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, USA), integrity of RNA was determined using a Bioanalyzer®(Agilent, Waldbronn, Germany) cDNA synthesis, target hybridization, probe array washing, staining and subsequent probe array scanning were done according to the standard protocol 3'IVT Express Kit User Manual (Affymetrix). Microarray analysis was performed by using Affymetrix Mouse Gene Chip 1.0 Array, using three microarrays per treatment.

3.2. Microarray experiments and data acquisition processing

Signal intensities from each array were analyzed using Partek Genomic Suite 6.4 (Partek Inc., Missouri, USA). Raw intensity probe

values were normalized using robust multiarray analysis background correction (RMA). A two way ANOVA was performed to identify differentially expressed genes. Only genes with statistically significant differences in expression levels (p-value < 0.05) and a fold change criteria of ≥ 1.5 and ≤ -1.5 were included in the final set of differentially expressed genes (Table 1).

3.3. Gene ontology (GO) analysis

The list of genes with significantly changed expression levels for both treatments revealed 46 genes up and 72 downregulated genes; meanwhile, for soulatrolide 665 up and 1077 downregulated genes were used as input lists for the DAVID Functional Annotation Clustering tool [2]. This open source software provides an enrichment analysis of annotation and gene ontology terms based on a GO: TermFinder. The corrected p-value was obtained by applying Bonferroni correction [2].

Acknowledgments

Juan Carlos Gomez Verjan is grateful with Posgrado en Ciencias Biomedicas-UNAM and CONACyT for providing a scholarship number 220346. This work was submitted in fulfillment of the requirements to obtain PhD degree at Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México. This research was supported by grant IG200513 from DGAPA-UNAM. Ignacio Gonzalez-Sanchez was supported by a post-doctoral grant (DGAPA-UNAM). This research was supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, USA (D-M-V).

References

- [1] C. Ruiz-Marcial, R. Reyes Chilpa, E. Estrada, J. Reyes-Esparza, G.G.G. Fariña, L. Rodríguez-Fragoso, Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. 59 (2007) 719–725 (<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524238>).
- [2] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 4 (2008) 44–57. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.

Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells

Juan C. Gomez-Verjan^{a,b}, Edgar A. Estrella-Parra^{a,b}, Ignacio González-Sánchez^{a,b}, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez^b, Edgar Vergara-Castañeda^b, Marco A. Cerbón^b and Ricardo Reyes-Chilpa^a

^aDepartamento de Productos Naturales, Instituto de Química, ^bDepartamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Distrito Federal, México

Keywords

Calophyllum brasiliense; cytotoxicity; K562 leukaemia cells; mammae A/BA + A/BB; Osiris-Molinspiration analysis

Correspondence

Juan C. Gomez-Verjan and Ricardo Reyes-Chilpa, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Distrito Federal, México.

E-mail: juancarlosgomezverjan@yahoo.com.mx; chilpa@unam.mx

Received December 5, 2013

Accepted February 23, 2014

doi: 10.1111/jpp.12245

Abstract

Objectives The aim of this study was to determine the cellular and molecular mechanisms of cell death induced by mammae A/BA and A/BB (3 : 1) on K562 cells.

Methods These compounds were isolated from *Calophyllum brasiliense* and its cytotoxicity was tested using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Cell death was evaluated by Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and immunocytofluorescence of active caspase-3. Genotoxicity was tested using comet assay. Lastly, a chemoinformatic analysis was performed with Osiris-Molinspiration software.

Key findings The mixture of mammae A/BA and A/BB (3 : 1) showed cytotoxic activity against K562 cells (IC₅₀ = 43.5 μM). TUNEL positive cells and active caspase-3 were detected after treatment. Genotoxicity of mammae A/BA and A/BB on K562 was detected since first hour of treatment. Additionally, mammae A/BA and A/BB were found to be in compliance with Lipinski 'rule of 5' suggesting that they possess strong potential of druglikeness.

Conclusions The overall results confirm and extend the knowledge about coumarins as an important resource of antitumor drugs, and indicate that these compounds could be used in further preclinical studies against leukaemia.

Introduction

Although many studies have been done about prognosis and diagnosis of cancer due to recent advances in genomics, there is still too much to do in the field of therapeutical treatment of this pathology, as there are very limited numbers of drugs approved for the pharmacological treatment of these diseases. Natural products are very rich sources of active molecules that could be used to develop new drugs against cancer; some of them are already in use, such as vincristine, vinblastine, vinorelbine, vindesine, etoposide, teniposide, paclitaxel, docetaxel, topotecan, irinotecan, among others.^[1] However, there is an increased requirement of new and more efficient drugs against different types of cancer, since it has been predicted that there are

expected 21.3 million of new cancer cases and about 13.1 million deaths by 2030 worldwide.^[2]

Calophyllum brasiliense (Clusiaceae) is a tropical rainforest tree of the American continent with important antitumor properties.^[3] The leaves of *C. brasiliense* contain coumarins, among them mammae A/BA and A/BB (Figure 1), which have shown significant cytotoxic activity against K562 (leukaemia) cells, as well as in other cell lines, including PC3 (human prostate adenocarcinoma) and U251 (human neuronal glioblastoma). An 50% inhibition of viability (IC₅₀) = 4.05 μM was determined for a mixture of mammae A/BA + A/BB against K562 cells using sulphorodamine assay.^[3] Antiproliferative and antitumor

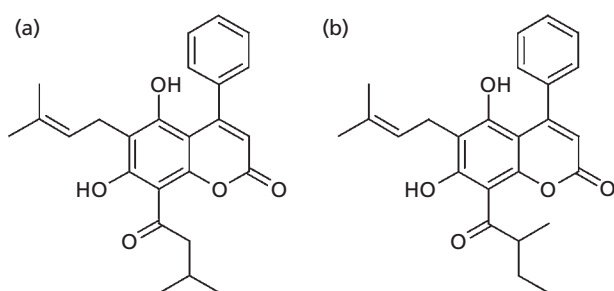


Figure 1 Chemical structures mammea coumarins: (a) mammea A/BA and (b) mammea A/BB.

activity *in vivo* have also been reported for the mixture of mammea A/BA and A/BB (2 : 1) in mice injected with BMK (baby mouse kidney cells), showing an inhibition of 83% of tumour size after 4 weeks of treatment. Moreover, mammea A/BA (Figure 1a) has shown low cytotoxicity to normal human lymphocytes *in vitro* with an $LC_{100} = 126.45 \mu\text{g/ml}$.^[4] With relation to acute toxicity *in vivo*, a preliminary report indicated that a mixture mammea A/BA and A/BB (2 : 1) intraperitoneally administered (i.p.) was innocuous to mice in a dose range up to 3500 mg/kg. The subacute toxicity for this mixture was investigated in mice administering 20 mg/kg i.p. every third day during 1 month; no mortality and no visible signs of toxicity were observed after this period. Histological and macroscopic observations of liver, kidney, spleen and thymus did not detected any noticeable alterations as compared with untreated mice.^[5] A related coumarin, mammea A/AA, has shown to induce cytotoxicity in HeLa, CaLo (human cervical carcinoma), SW480 (human colon adenocarcinoma) and SW620 human (colorectal adenocarcinoma derived from lymph node metastasis) showing an induction of caspase independent apoptosis-like cell death in HeLa cells mediated by the early release of apoptosis-inducing factor. This proapoptotic protein is released from the mitochondrial intermembrane space to the cytoplasm by treated cells.^[6] In another study of these coumarins, Ito *et al.*^[7] found that calophyllolide and mammea B/BB isolated from *C. brasiliense* induced apoptosis in the HL-60 (human leukaemia) cell line through activation of the caspase-9/caspase-3 pathway.

The above features suggest that mammea type coumarins may represent potential anticancer drugs with low toxicity, suitable to be developed in clinical oncology. Extracts containing these compounds could also be developed as phytomedicines. To our knowledge, this is the first study regarding the molecular mechanism involved in cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis induced by mammea-type coumarins (A/BA + A/BB) on the K562 cell line, as well as the first chemoinformatic analysis for this type of coumarins, where druglikeness and ADMET properties are tested.

Materials and Methods

Isolation and identification of coumarins

Calophyllum brasiliense leaves were collected in the State of Veracruz, Mexico. Vouchers were deposited at the Instituto Mexicano del Seguro Social Medicinal Herbarium with number 1523A. The leaves were dried at room temperature and then powdered (1 kg). The extract was prepared by maceration with hexane until exhaustion, and further concentrated '*in vacuo*' in a rotary evaporator. Compounds were isolated using column chromatography on silica gel-60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, UV and compared with previous reports.^[3] The yield of mammea coumarins was estimated as 1.5% of the leaves' dry weight. For the biological studies, a mixture of coumarins, mammea A/BA and mammea A/BB at a ratio of 3 : 1 was used. The content of each compound in the mixture was determined by ¹H NMR^[8] using integration of OH-7, and assuming 100% for both compounds.

Cell culture

Human leukaemia cells (K562) obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) were cultured with Dulbecco's Modified Eagle Medium medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and antibiotics. All cell cultures were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cytotoxicity assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to evaluate the cytotoxic effects of coumarins against K562 cells. Briefly, 5000 cells/well were seeded in 96-well microplates. After 24 h, cells were incubated with coumarins (3 : 1) at 0.01–200 μM and *C. brasiliense* hexane extract at 50 $\mu\text{g/ml}$; dimethyl sulfoxide (DMSO) at final concentration of 0.01% was used as vehicle. After 48 h of treatment, the MTT assay was performed and relative viability was calculated as described previously.^[9] The concentration leading to IC₅₀ was calculated by regression analysis (percent survival vs log concentration).

Apoptotic assays

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

The in-situ DNA fragmentation was detected by Dead End Fluorometric TUNEL system according to the manufacturer's instructions (Roche, Diagnostics Corp.; Indianapolis, IN, USA). K562 cells were seeded at 5×10^5 on 60 mm Petri plates and transferred to glass coverslips with further incubation of 24 h. K562 cells were treated with mammea A/BA + A/BB (3 : 1) 43 μM , Taxol 0.25 μM or vehicle

(DMSO) for 24 h. After incubation, cells were treated as described by González-Sánchez *et al.*^[9] The samples were analysed by fluorescence microscopy.

Caspase-3 active analysis by immunocytofluorescence

Cells were plated onto coverslips and incubated with different treatments for 18 h ($n = 3$). After treatment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with 0.1% Triton X-100 in TBS Tween for 1 h, and then blocked with a 5% BSA TBS Tween solution for 1 h. Cells were incubated with a polyclonal rabbit anti-caspase-3 (activated) antibody at a 1 : 250 dilution (BioVision, 3015-100, Milpitas, CA, USA) at 4°C overnight. Alexa Fluor 546 anti-rabbit IgG secondary antibody at a 1 : 500 dilution (Invitrogen, A11030, Grand Island, NY, USA) was incubated for 1 h at room temperature under dark conditions. Coverslips were mounted using 4',6-diamidino-2-phenylindole. Samples were observed in a Nikon E600 microscope digital camera (Nikon, Melville, NY, USA). As negative controls, coverslips without primary antibody were processed. Image J software was used to composite images.

Single-cell gel electrophoresis (comet assay)

Cells were harvested for the examination of DNA damage by using comet assay according to published procedures^[10,11] with slight modifications. Briefly, about 1×10^4 cells per sample from each treatment were used. Comets were visualized and photographed using a fluorescence microscope at 100 \times as previously described^[12] after staining with 5 μ l of gel red (1 : 5000) (41003, Biotium, Hayward, CA, USA). The mean percentage of DNA in the tail (%tailDNA) served as the indicator of DNA damage.^[13] Image processing was performed according to the image processing handbook.^[14]

Plasmid nicking assay

This assay was carried out as described by Habib and Shams.^[15] Covalently closed circular pDest26 DNA (0.5 μ g) was treated with the coumarins mixture at 43.5 and 430 μ M in a total volume of 20 μ l for 3 h. Electrophoresis was performed on 1% agarose gels (50 mA for 2 h) and stained with gel red (0.5 μ g/l). The bands were visualized on a UV transilluminator using the VisionWorksLS Software (UVP, Upland, CA, USA).

Statistical analysis

All data were processed by using GraphPad Prism Software version 5.00.28 (San Diego, CA, USA). One-way analysis of variance test was used to examine the statistical difference of experimental data between the groups. The significance was defined as $P < 0.05$.

Chemoinformatic Osiris and Molinspiration (OM) analysis of mammea A/BA and A/BB

Lipinski's rule

The rule formulated by C. A. Lipinski *et al.*^[16] is important for drug development where a pharmacologically active lead structure is optimized stepwise for increased activity and selectivity, as well as drug-like properties.^[17] Computational methods are well established in drug discovery and molecular design; however, their application in the field of natural products is still in its infancy.^[18,19] Therefore, it was interesting to us to test mammea A/BA and A/BB with Lipinski's rules to realize its ADMET liabilities.

Properties calculated using Osiris programme

Osiris is a free online programme that calculates lipophilicity, expressed as clogP, solubility in water, expressed as logS, molecular weight, druglikeness indices and drug scores; moreover, toxicological properties of the compounds may be shown.^[20] Osiris was used to assess the possible toxicity risks, as well as the aforementioned biophysical properties of mammea A/BA and A/BB. The description of a computational medicinal chemistry class involving in-silico toxicology can be found in De Brito.^[21]

Properties calculated using Molinspiration

CLogP (octanol/water partition coefficient) is calculated by the methodology developed by Molinspiration as the sum of fragment-based contributions and correction factors. Molecular polar surface area (PSA) topological polar surface area TPSA is calculated based on the methodology published by Ertl *et al.*^[22] as the sum of fragment contributions. Molecular PSA has been shown to be a very good descriptor characterizing drug absorption, including intestinal absorption, bioavailability, CaCo-2 permeability and blood-brain barrier penetration.

Results

Identification of coumarins

The ¹H and ¹³C-NMR spectra data were determined and compared with those reported by Crombie and Games.^[8]

Cytotoxic activity of mammea type coumarins

The mixture of coumarins mammea A/BA + A/BB (3 : 1), as well as the hexane extract of *C. brasiliense* displayed cytotoxic activity against K562 at 50 μ g/ml, showing 90% and 70.4% inhibition, respectively. The IC₅₀ of the coumarin mixture (3 : 1) was $43.5 \pm 6 \mu$ M.

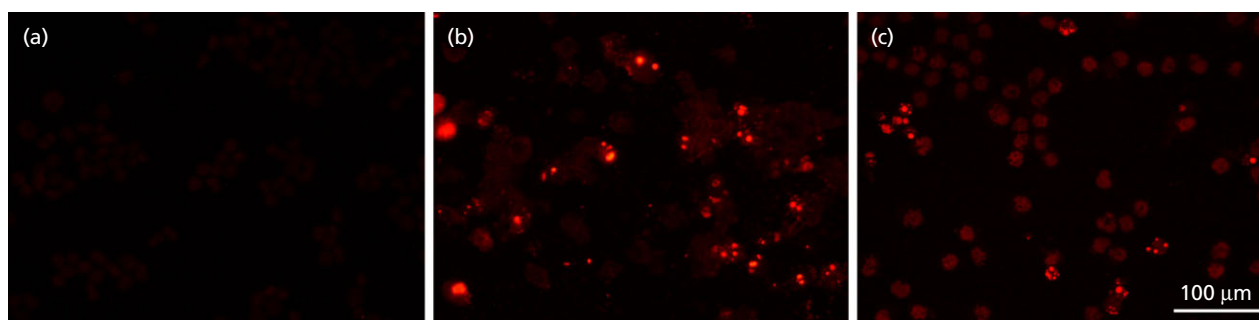


Figure 2 DNA fragmentation pattern in K-562 cells induced by mammea A/BA + A/BB treatment. Cells were incubated during 24 h with different treatments: (a) vehicle (DMSO 0.01%); (b) mammea A/BA + A/BB (3 : 1) 43.5 μM ; (c) taxol (0.25 μM). Representative images from three independent experiments. Scale bar = 100 μm .

Coumarins induce apoptosis on K562

The TUNEL assay showed a marked DNA cleavage pattern in K562 cells after 24 h treatment with the coumarins mixture at 43.5 μM (Figure 2b), as well as with the positive control (0.25 μM taxol, Figure 2c) in comparison with the vehicle (DMSO, Figure 2a). Cellular nuclei fragmentation was evident after treatment of K562 cells with coumarins mixture or Taxol.

To determine the mechanism of cell death, immunocyto-fluorescence was performed to assess activated caspase-3 (Figure 3). Activated caspase-3 was detected in K562 cells treated with the coumarins mixture at 43.5 μM (Figure 3e and 3f) and Taxol (0.25 μM) (Figure 3g to 3i) after 18 h. At this time, caspase-3 is active in most of the cells treated with coumarins as compared with vehicle (DMSO). No cell damage was detected in control cells treated with vehicle.

Genotoxicity of coumarins on K562 cells

Results for comet assay are shown in Figure 4. We performed this assay at 1 h, 3 h and 12 h. Results show %tailDNA for each treatment. Increasing genotoxicity after 1 h of coumarins treatment was observed. To determine a possible direct interaction between DNA and mammea type coumarins, the plasmid nicking assay was performed with pDest26 plasmid at 43.5 μM and 435 μM ; however, no interaction between naked DNA and coumarins at any dose could be observed (data not shown).

Coumarins possess drugability qualities

Biophysical, as well as toxicological parameters calculated with the Osiris programme are shown in Table 1. Bioactive and chemical scores determined by Molinspiration are summarized in Tables 2 and 3.

Discussion

The results of this study indicated that the coumarins mixture (mammea A/BA + A/BB 3 : 1) display cytotoxic

Table 1 Molecular pharmacokinetic and toxicological properties of mammea A/BA and A/BB

Osiris		
MW	408	408
cLogP	5.35	5.78
logS	-5.31	-5.59
DL	-3.09	-2.75
DS	0.17	0.16
Mutagenic	+	+
Tumorigenic	+	+
Irritant	+	+
Reproductive effect	++	++

clogP, lipophilicity; DL, druglikeness; DS, drugscore; logS, solubility; MW, molecular weight. Toxicological risk according to Osiris program respectively +++ for high risk, ++ represent medium risk and + low risk.

activity against K562 leukaemic cells, which is mediated via apoptosis (Figures 2b, 3e and 3f); in addition, these compounds presented genotoxic activity as demonstrated by comet assay.

Cytotoxicity induced by coumarins mixture (mammea A/BA + A/BB 3 : 1) on K562 cells showed an IC₅₀ of 43.5 μM at 48 h. Interestingly, mammea A/BA has shown low cytotoxicity to normal human lymphocytes *in vitro* with an LC₅₀ = 50.51 $\mu\text{g}/\text{ml}$.^[4] Furthermore, a mixture mammea A/BA and A/BB (2 : 1) was innocuous *i.p.* to mice in a dose up to 3500 mg/kg.^[5] To determine if cytotoxicity was mediated by apoptosis, we performed a TUNEL assay. DNA fragmentation was observed at 24 h (Figure 2b) in treated cells, as compared with control (Figure 2a). Activation of caspases plays a central role in the execution stage of apoptosis,^[23] particularly, activation of caspase-3 is a crucial event leading to apoptosis.^[24] To improve comprehension into molecular changes induced by coumarins on K562 cells, we analysed if caspases are involved in the cell death of these cells. The activity of caspase-3 was confirmed 18 h after coumarins treatment (Figure 3e and 3f), while it was completely inactive in cells treated with vehicle

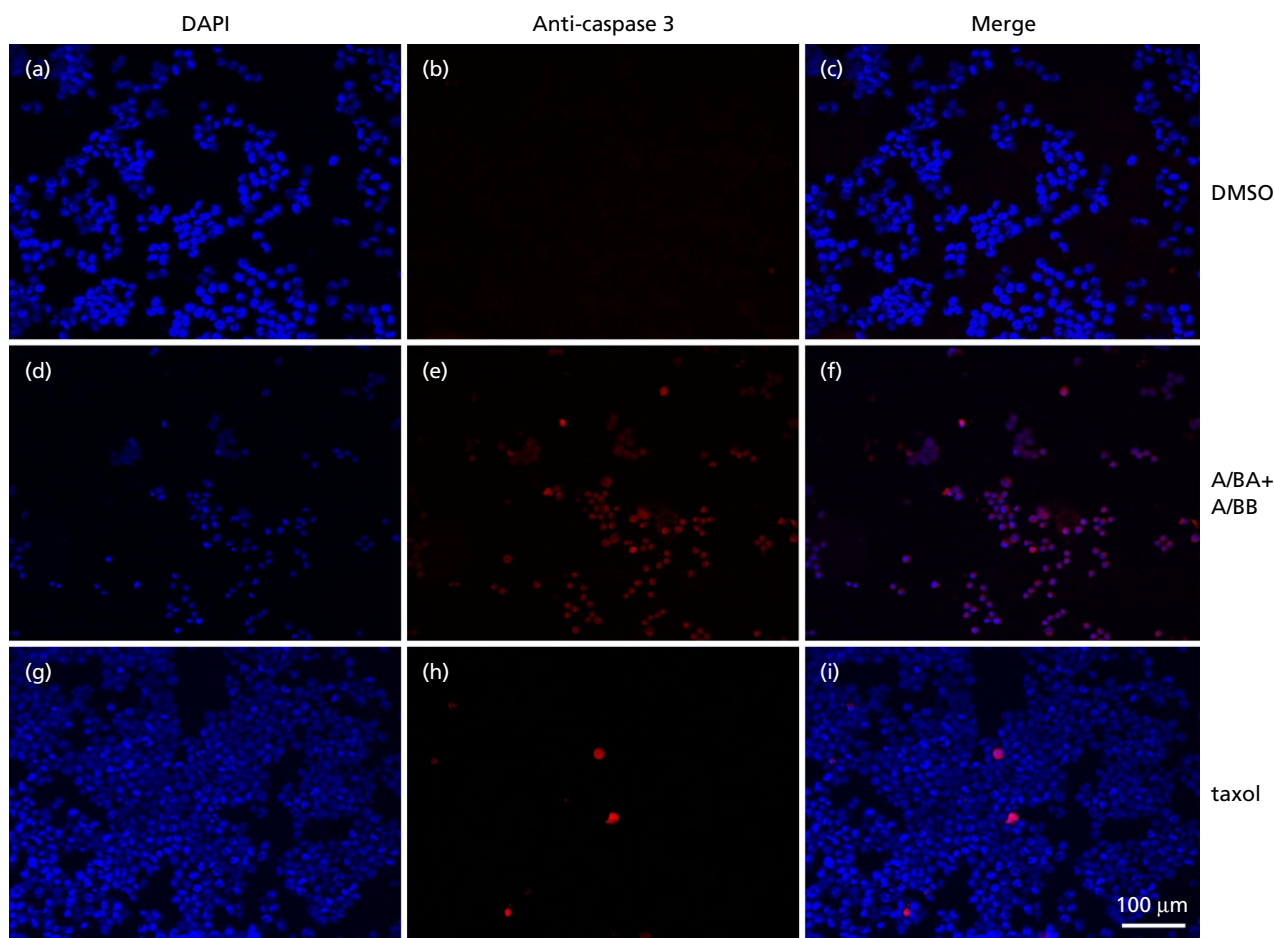


Figure 3 Detection of caspase-3 activated on K562 treated cells. Cells were incubated 18 h with different treatments: DMSO: (a) DAPI, (b) activated anti-caspase 3, (c) Merge. Coumarin mixture: (d) DAPI, (e) activated anti-caspase3, (f) Merge. Taxol: (g) DAPI, (h) activated anti-caspase3, (i) Merge. Representative images from three independent experiments. Scale bar = 100 μm .

Table 2 Bioactivity scores of mammea A/BA and A/BB

	Molinspiration bioactivity score					
	GPCR ligand	Ion channel modulator	Kinase inhibitor	Nuclear receptor ligand	Protease inhibitor	Enzyme inhibitor
Mammea A/BA	-0.16	-0.22	-0.31	0.21	-0.18	0.36
Mammea A/BB	-0.15	-0.17	-0.32	0.28	-0.14	0.41

GPCR, G protein coupled receptor.

Table 3 Druglikeness score of mammea A/BA and A/BB

	Molinspiration							
	miLogP	natoms	PSA	MW	nViolations	HBA	HBD	Nrotb
Mammea A/BA	2.88	30	88.9	408	0	5	3	6
Mammea A/BB	2.85	30	88.9	408	0	5	3	6

HBA, hydrogen bond acceptor; HBD, hydrogen bond donor; miLogP, lipophilicity; MW, molecular weight; Nrotb, number of rotatable bonds; PSA, polar surface area \AA .

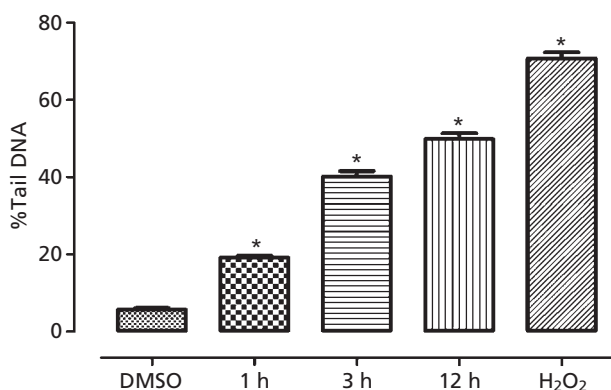


Figure 4 Genotoxicity of mammea A/BA + A/BB (comet assay). Comet assay at 1 h, 3 h and 12 h of treatment with 43.5 μM of mammea A/BA + A/BB (3 : 1), DMSO (0.01%) as negative control, and H₂O₂ (10%, 15 min) as positive control. % TailDNA = 100 – Head% DNA. Comet assay at 1 h, 3 h and 12 h of treatment with 43.5 μM of mammea A/BA and A/BB (3 : 1). H₂O₂ (10%, 15 min). All data are means \pm SD of triplicates. Each experiment was conducted thrice. * $P < 0.05$.

(Figure 3a–c). Together, these results indicate that coumarins mixture induce apoptotic cell death in K562 cells through caspase pathway, which can be activated by the mitochondrial death, or the death receptor pathways. Our results agree with previous studies for other mammea-type coumarins from *C. brasiliense*, such as calophyllolide and mammea B/BB, which also showed induction of apoptosis via caspases activation.^[7,25] Nevertheless, more experiments are required to clarify the early stages of the process.

On the other hand, we evaluated genotoxicity of coumarins on K562, through the comet assay (Figure 4). Coumarins induced DNA damage in a time-response manner. Damage was evident after 1 h of treatment, reaching more than 50% after 12 h; however, it was not as severe compared with positive control (H₂O₂) after 15 min. These experiments demonstrated that coumarins possess genotoxicity properties in the K562 cell line. To our best knowledge, this is the first report of such matter for this type of coumarins; for this reason, we tested if genotoxicity was due to structural interactions between coumarins and DNA. Therefore, we performed plasmid nicking assay with pDest26, at 43.5 μM and 435 μM ; however, no activity between naked DNA and coumarins was observed, suggesting that genotoxicity is induced by a mechanism not directly related to structural interaction. Genotoxicity could explain apoptosis induction due to severe DNA damage, and highlights the potential of such compounds to be used in genotoxic chemotherapy against cancer.^[26]

Since many potential drugs fail to reach clinical stage because of ADME-Tox liabilities, we performed chemoinformatic approach (OM analysis) of coumarins. In all cases, we found similar characteristics for both type of

coumarins. Interestingly, both were found in compliance with Lipinski's 'rule of 5', for instance, miLogP was below five, suggesting that these compounds have good permeability across the cell membrane, which is needed for bioactivity. No violations to the rules were found, which means that both compounds will easily bind to their possible target. PSA were below 160 Å, which implies that molecules are fulfilling the optimal requirement for drug absorption. An organic molecule is considered active, if its bioactivity score is >0 . Interestingly, both type of coumarins showed potential as enzyme inhibitors, and displayed characteristics as nuclear receptor ligands. Coumarins showed to be safe drugs, without any tumorigenic, mutagenic and irritant effects, as evaluated in Osiris explorer, this is also supported by drugscore (0.17–0.16), which is supported by in-vivo toxicological data.^[5] However, Osiris explorer also suggests that mammea coumarins could have slight effects on reproduction, which must be evaluated. Positive values are expected for good druglikeness, indicating the presence of structural fragments commonly found in commercial drugs, which does not necessarily mean that these fragments are well balanced with other properties. For instance, a molecule may be composed of drug-like moiety, but with lipophilic fragments only; this molecule will have a high druglikeness score, although it would not really qualify for being a drug because of its high lipophilicity.^[27] Coumarins druglikeness was estimated in the range of -3.09 and -2.79 , but showed other properties which all together indicate strong potential for mammea A/BA and A/BB with the aim to introduce them for clinical studies in the treatment of leukaemia.

Conclusion

In conclusion, mammea-type coumarins could be promising chemotherapeutic agents against cancer, such as leukaemia, since our results, in agreement to other previous reports, displayed significant cytotoxicity on K562 cells as well as in other several leukaemia cancer cell lines.^[3,6,7,25,28] In addition, coumarins show significant drugscore; therefore, these compounds could be considered for preclinical studies against leukaemia.

Declarations

Conflict of interest

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

Acknowledgements

Juan Carlos Gomez Verjan is grateful with Posgrado en Ciencias Biomedicas-UNAM and CONACyT for providing a scholarship number 220346. This work was submitted in

fulfilment of the requirements to obtain PhD degree at Doctorado en Ciencias Biomédicas and Universidad Nacional Autónoma de México. This research was sup-

ported by grant IG200513 from DGAPA-UNAM. Authors are grateful to Jorge Castillo Arellano for collecting and identification of botanical specimens.

References

- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75: 311–335.
- Ferlay J *et al.* Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer-Base no. 10. *GLOBOCAN* [online] 2008 v20. 2008. Available at: <http://globocan.iarc.fr>. (Accessed 11 November 2013).
- Reyes-Chilpa R *et al.* Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci* 2004; 75: 1635–1647.
- Reyes-Chilpa R *et al.* Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 431–436.
- Ruiz-Marcial C. *Pharmacological and Toxicological Study of Coumarins Isolated from Calophyllum Brasiliense on the Experimental Tumorigenesis*. Mexico, Mexico City: National Autonomous University of Mexico, 2005.
- Alvarez-Delgado C *et al.* Coumarin A/AA induces apoptosis-like cell death in HeLa cells mediated by the release of apoptosis-inducing factor. *J Biochem Mol Toxicol* 2009; 23: 263–272.
- Ito C *et al.* Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 975–980.
- Crombie L, Games DE. Isolation and structure of mammea A/BA, A/AB and A/BB: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *Mammea americana* L. *Tetrahedron Lett* 1966; 7: 145–149.
- González-Sánchez I *et al.* Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 2102–2108.
- Chen C-Y *et al.* Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189: 153–159.
- Wang SC *et al.* 2- and 4-Aminobiphenyls induce oxidative DNA damage in human hepatoma (Hep G2) cells via different mechanisms. *Mutat Res* 2006; 593: 9–21.
- Lu H-F *et al.* Danthron induces DNA damage and inhibits DNA repair gene expressions in GBM 8401 human brain glioblastoma multiforms cells. *Neurochem Res* 2010; 35: 1105–1110.
- Barjhoux I *et al.* Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 79: 272–282.
- Russ JC. *The Image Processing Handbook, 2nd edn*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995: 674.
- Habib A, Shams S. Short-term *in vitro* and *in vivo* genotoxicity testing systems for some water bodies of Northern India. *Environ Monit Assess* 2011; 180: 87–95.
- Lipinski C *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 23: 3–26.
- Verma A. Lead finding from *Phyllanthus debelis* with hepatoprotective potentials. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: S1735–S1737.
- Zaid H *et al.* Physicochemical properties of natural based products vs synthetic chemicals. *Open Nutraceuticals J* 2010; 3: 194–202.
- Ertl P, Schuffenhauer A. Cheminformatics analysis of natural products: lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Prog Drug Res* 2008; 66: 218–235.
- Höskuldsson A. PLS regression methods. *J Chemometrics* 1988; 2: 211–228.
- De Brito MA. Evaluation of toxicological properties of drugs *in silico* experimental course in medicinal chemistry. *Rev Eletr Farm* 2010; 7: 22–29, (in Portuguese).
- Ertl P *et al.* Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 2000; 43: 3714–3717.
- Patel T *et al.* The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996; 10: 587–597.
- Zou H *et al.* Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405–413.
- Kimura S *et al.* Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int J Cancer* 2005; 165: 158–165.
- Walsh D. Genotoxic Drugs. [online] 2012: Available at: <http://www.cancerquest.org/genotoxic-chemotherapy-drugs.html>. (Accessed 11 November 2013).
- Molinspiration Cheminformatics. *Molinspiration Cheminformatics* 2013. Available at: <http://www.molinspiration.com/>. (Accessed 11 November 2013).
- Jin L *et al.* Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br J Cancer* 2011; 104: 91–100.

Trends in the chemical and pharmacological research on the tropical trees *Calophyllum brasiliense* and *Calophyllum inophyllum*, a global context

J. Gómez-Verjan¹ · I. Gonzalez-Sanchez¹ · E. Estrella-Parra¹ · R. Reyes-Chilpa¹

Received: 11 August 2015
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2015

Abstract Tropical trees of *Calophyllum* genus (Calophyllaceae) have chemical and biological importance as potential source of secondary active metabolites which can lead to the development of new drugs. Research on this species has been rising since 1992 due to the discovering of anti-HIV properties of Calanolide A found in *Calophyllum inophyllum* leaves. This compound is the most important natural product for potential development of new anti-HIV drugs and phytomedicines. The scientometric analysis (1953–2014) here performed revealed that the most studied species of *Calophyllum* genus are: *C. inophyllum* and *C. brasiliense*, distributed in the Asian, and American continents, respectively. Current research on these species is carried out mainly in India and Brazil, respectively, where these species grow. Research on *C. brasiliense* is focused mainly on ecological, antiparasitic, cytotoxic properties, and isolation of new compounds. Chemical studies and biodiesel development are the main topics in the case of *C. inophyllum*. Text mining analysis revealed that coumarins, and xanthenes are the main secondary active metabolites responsible for most of the reported pharmacological properties, and are potential compounds for the treatment of leukemia and against intracellular parasites causing American Trypanosomiasis and Leshmaniasis. On the other hand, *C. inophyllum* represents an important source for the development of 2nd generation biodiesel. Medicinal and industrial applications of these species may impulse sustainable forest plantations. To our knowledge this is the first scientometric and text mining analysis of chemical and biomedical research on *Calophyllum* genus, *C. brasiliense* and *C. inophyllum*.

Keywords *C. brasiliense* · *C. inophyllum* · Text mining · Natural products · *Calophyllum* spp.

✉ R. Reyes-Chilpa
chilpa@unam.mx

¹ Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Distrito Federal, Mexico

Mathematics Subject Classification 92-08 (Biology and other natural sciences—computational methods)

Abbreviations

RT	Reverse transcriptase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
XAO	Xanthine oxidase
ACE	Angiotensin converting enzyme
PAF	Platelet-activating factor
SULT1A1	Sulfotransferase 1A1
SULT1A2	Sulfotransferase 1A2

Introduction

Pharmaceutical industry is facing a productivity crisis, as there is a stagnant in the number of new drug approvals, and an increasing expenditure in the research and development processes (Rafols et al. 2014). Natural products have been proposed to develop new drugs that could be effectively introduced into the pharmaceutical market (Butler et al. 2014), or as phytomedicines (plant extracts chemically and pharmacologically standardized). In this context, *Calophyllum* genus, a large group (180–200 species) of tropical trees belonging to the Calophyllaceae family, and mainly distributed in tropical regions of Asia, Africa, the Americas, Australasia, and the Pacific Islands (Stevens 1980), represent an important source of natural products, mainly coumarins, xanthenes, flavonoids, biflavonoids, chromanones, and triterpenes, with significant biological activities such as cytotoxic, antiviral, chemopreventive, antisecretory, cytoprotective, analgesic, and antimicrobial properties (Saklani and Kutty 2008; César et al. 2011). Some species of this genus are used in folk medicine to treat peptic ulcers, malaria, tumors, infections, venereal disease, blood pressure, diuretic, pain, and inflammation (Filho et al. 2009). Among *Calophyllum* spp. the two most important species are: *Calophyllum brasiliense* which is widely distributed in the American continent, from Brazil to Mexico, and *Calophyllum inophyllum* located in Asia, Africa, Pacific region, and Australia.

Calophyllum brasiliense

It is a large tree of the Tropical Rain Forests, and distributed mainly in Central, and South America and the Caribbean region; it can reach 40 m height and 1–3 m diameter. In Brazil is commonly known as “Guanandi”, and is used in traditional medicine to treat rheumatism, varicose hemorrhoids, ulcers, inflammation, and pain (Filho et al. 2009). In Mexico, its most common name is “Bari”, and the infusion of the cortex is consumed in the Sierra de Atoyac, Guerrero by women over 9 days for “cleaning” the womb after child-birth, while the seeds provide an oil used for lighting and for healing skin afflictions (Reyes-Chilpa et al. 2008; Do Carmo Souza et al. 2009). In Colombia, the peasants call this tree “árbol de aceite” (oil tree), and the yellow latex exuded from the cortex is applied topically for healing the navels of newborn children (García-Barriga, 1992). There are several studies about biological activities of this species: antimicrobial, cytotoxic, anti-neoplastic, antispasmodic, antinociceptive, anti-HIV, and antiulcer properties (Reyes-

Chilpa et al. 2004, 2008; Huerta-Reyes et al. 2004; Brenzan et al. 2007, 2008, 2012). Briefly, brasiliensic acid and isobrasiliensic acids have been isolated from stem resin, 1,5-dihydroxyxanthone, friedelin, and betulinic acid from the roots; gallic and protocatechuic acid from the fruits (Da Silva et al. 2001). Protocatechuic acid and epicatechin were isolated from the flowers (Isaias et al. 2004). From the trunk bark different xanthenes were isolated: brasixanthone A, B, C, D, E, F, G, and toxiloxixanthone A, 6-desoxijacarubine, 3,8-dyhydroxy-1,2-dimethoxyxanthone, 8-desoxygartanin, cudraxanthone F, 4-hydroxyxanthone, 1,2-dimethoxyxanthone, piranojacareubine, garcinin B, and latisxanthone C (Filho et al. 2009). Moreover, polyphenols have been isolated from AcOEt fractions of leaves: quercetin, amentoflavone, hyperoside, gallic and proatechuic acid (Da Silva et al. 2001). Finally, different types of coumarins have been isolated from different polar and non polar extracts of leaves: dipyrancoumarins, such as calanolides A, B, C, D, and E and soulatrolide, and on the other hand 5,7-dyoxy coumarinic coumarins of the mammea type such as mammea type A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/AO, C/OB, B/BA, B/BA F cycle, and B/BB F cycle among others. It has been proposed the existence of two different chemotypes (chemical phenotypes) of *C. brasiliense* based on the kind of main compounds that are biosynthesized (Zavaleta-Mancera et al. 2011).

Calophyllum inophyllum

It is a large tree native from the Tropical Rain Forests of Australasia, and East Africa, and commonly known as *Alexandrian laurel*. It can reach 22 m of height; the flowers are used in some countries for ornamental purposes. It has many traditional uses in different countries. The fruit oil is indicated to treat rheumatism, gonorrhoea and itching; the bark is used to treat hemorrhage, ulcer, and as an expectorant, antiseptic, diuretic and purgative (Potti and Kurup 1970). This species has been widely studied from a phytochemical perspective. Briefly, from roots it have been isolated: caloxanthone A and B, 1,5-dihydroxyxanthone-6-desoxijacarubin, epicatechin, amentoflavone, inophyllum, isoinophyllum, inophyllin A, friedelin and stigmaterol (Jantan et al. 2001). In addition, 4-phenylcoumarins inophyllum A, C, D and E, three tricyclic coumarins such as calocoumarin A, B, and C, calofoloid, apetatolide, and phenolic cinnamic acid have also been isolated from the roots. Several xanthenes such as inoxanthone, caloxanthone A and B, macluraxanthone, 1,5-dihydroxyxanthone, calophynic acid, brasiliensic acid, inophylloic acid, calaustralin, calophyllolide, and inophyllum C and E have been isolated the leaves, as well as, friedelin-type triterpenoids, such ascanophyllol, canophyllic acid, friedelin, friedelan-3-one, 3,4-secofriedelane-3,28-dioic acid, 27-(acetyloxy) canophyllic acid, and 27-(acetyloxy)-3-oxofriedelan-28-oic acid (Ito et al. 2006; Laure et al. 2005).

Nowadays there is an increase in biomedical research providing a rich source of knowledge for pharmaceutical research, most of this knowledge can get lost among the great number of papers produced each year, for example, searching on Scopus Database the word "Cancer" retrieved more than 132,736 results only for 2014; clearly it is impossible for one person to read all these publications. Nevertheless, the development of new powerful analytical tools for scientometric analysis, and text mining are now facilitating research by helping to find new knowledge for the development of chemical and biomedical research. For drug and pharmaceutical development (Zhu et al. 2013) in natural products databases could help to reduce hit multiplicity and improve the process of *hit to lead* identification, or biotechnological approach. In this paper, we perform a scientometric and text mining analysis of chemical and biomedical research on *Calophyllum* genus focusing mainly on *C. brasiliense* and *C. inophyllum*.

Results and discussion

Scientometric analysis

During the period 1953–2014 we found 626 published papers indexed in Scopus database referent to *Calophyllum* spp. most of them (554) are original papers, while the others are *errata*, notes to editor, conference papers, among others. The main Journals which have published the original contributions are Phytochemistry, Journal of Natural Products, Forest Ecology and Management, Tetrahedron Letters, and Planta Medica. Concerning to species, 139 papers are on *C. brasiliense*, and 222 papers on *C. inophyllum* (Fig. 1). This states that most of the research performed on *Calophyllum* genus has focused on phytochemical studies, biological properties of such compounds, and ecology research.

As depicted in Fig. 1, there is an increase in the number of publication in the 90s, rising up in 1994, this probably due to the fact that calanolides (a novel class of benzotripyranones) were reported in 1992 to be highly active against HIV-1, since it is a potent inhibitor of the viral enzyme reverse transcriptase (Kashman et al. 1992). Even so, calanolides A and B were reported to be highly active against HIV-1 replication (Patil et al. 1993), leading calanolide A to reach the clinical phase II with infected patients (Butler 2005) since it was found in the previous stage to be well tolerated by healthy volunteers showing mild side effects (Creagh et al. 2001). Until 2005 Calanolide A was considered as a promising candidate to be approved by the FDA as a new drug for HIV-AIDS treatment (Butler 2005); however, the development of Calanolide A and related compounds is currently on hold, and its fate will be decided by the Sarawak government who owns the pharmaceutical company (Saklani and Kutty 2008). It is interesting to note that the first patents that protect the pharmaceutical applications, and synthesis of this group of compounds are about to expire, since the first patents were conferred since 1997.

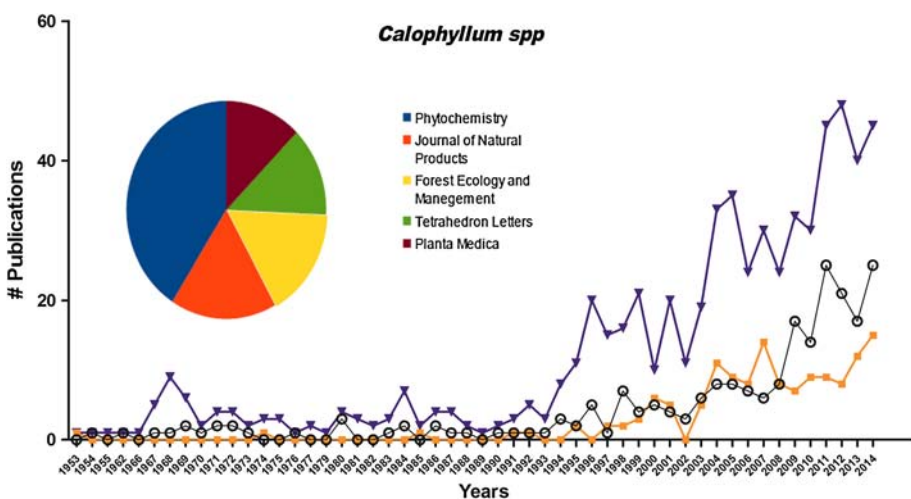


Fig. 1 Publications and main journals publishing research on inverted filled triangle: *Calophyllum* spp.; circle: *Calophyllum inophyllum*; and filled square: *Calophyllum brasiliense*

Another peak in research publications occurs in 2004, this might probably be due to the isolation of new tricyclic coumarins, and the discovering of new pharmacological activities (antimicrobial, antiparasite, antimalarial, and against coronavirus, among others) of the coumarins, chromanones, and xanthenes isolated from this genus (Su et al. 2008). Additionally interest in this genus, arises from the possible development of 2nd generation biodiesel from seeds of *C. inophyllum*, as it might represent an important source of non-edible oil (Atabani and César 2014).

As seen in Table 1, the main bibliometric indicators for the genus are a low PNC and *h* value, as well as *P*, indicating an increasing in the interest of research on this genus; nevertheless, there are more *P*, CPP and PR on *C. inophyllum* compared to *C. brasiliense*. This probably due to the fact that research on its biotechnological applications as a non edible oil source for 2nd generation biodiesel production have shown to be quite remarkable and productive, as the most quoted article on *C. inophyllum* is on this topic (Sanjid et al. 2013). On the other hand, for *C. brasiliense* the most cited articles have been for ecological applications, such as reforestation (Cusack and Montagnini 2004) (Fig. 1), nevertheless the CPP and PR on this species has been very low compared to *C. inophyllum*.

Table 2 indicates that the main countries that perform research on *Calophyllum* spp. are India, Brazil, USA, Malaysia and Japan, this is not surprising as most of these countries posses interesting research programs in natural products; moreover, the USA-NIH program for bioprospecting in collaboration with Malaysia government involved the development of calanolide A as a potential compound against HIV-1 that resulted in the creation of Sarawak Medichem Inc. Species of *Calophyllum* can also be found in the forest of several of the research leader countries, such as India, Brazil, and Malaysia. Brazil is the leader country on *C. brasiliense* research, and India is the main country for *C. inophyllum*.

The leader institutions in research on *Calophyllum* genus, *C. brasiliense* and *C. inophyllum* are University of Putra, Malaysia, Universidade Estadual de Maringá, and University of Malaysia, respectively. This is not surprising as the University of Putra Malaysia possess an interesting program for developing new products (PutraInnotech) among them natural products. University of Malaysia is located at Sarawak.

Table 2 and Fig. 2 show the main authors and co-authorship (more than five publications) leaders on research on *Calophyllum* spp. Richomme P. (Universite d'Angers) is the main author and co-author head in research of this genus, since he has the highest number of publications, specially on *C. caledonicum* and *C. dispar*. On the other side, Montagnini F.

Table 1 Scientometric indicators for research into *Calophyllum* spp.; *Calophyllum brasiliense*; and *Calophyllum inophyllum*, in the last 5 years 2009–2015

Indicator	<i>Calophyllum</i> spp.	<i>C. brasiliense</i>	<i>C. inophyllum</i>
<i>P</i>	240	60	119
<i>C</i>	1507	231	1132
CPP	6.2	3.8	9.5
PNC	33.8	35	36.1
PR	8.3	1.5	6.7
<i>h</i>	17	9	15

The indicators are: number of publications (*P*), number of citations (© mean number of citations per publication (CPP), percentage of publications not cited (PNC), percentage of reviews (PR) and Hirsch index (*h*)

Table 2 Top main countries, authors and institutions involved into *Calophyllum* spp. research, according to Scopus database

<i>Calophyllum</i> spp.	<i>P</i>	<i>h</i>	<i>C. brasiliense</i>	<i>P</i>	<i>h</i>	<i>C. inophyllum</i>	<i>P</i>	<i>h</i>
<i>Top 5 main countries</i>								
India	112	18	Brazil	80	18	India	80	16
Brazil	94	21	USA	26	10	Malaysia	26	10
USA	85	29	Mexico	18	16	Japan	18	11
Malaysia	55	14	Japan	10	8	China	18	5
Japan	46	21	Costa Rica	9	9	France	14	7
<i>Top 5 main authors</i>								
Richomme P.	15	11	Montagnini F.	10	10	Masjuki H.	12	8
Goh S.	14	8	Brenzan M.	9	6	Hathurusingha S.	7	3
Masjuki H.	12	4	Cortez D.	9	6	Ashtwa N.	7	2
Ee G.	11	8	Nakamura C.	9	5	Kalam M.	6	4
Sim K.	11	6	Reyes-Chilpa R.	9	10	Pawar K.	6	5
<i>Top 5 main institutions</i>								
U. Putra Malaysia	14	5	U. de Estadual de Maringa	17	6	U. of Malaya	13	9
U. of Malaya	10	10	Yale	17	10	U. of Ibadan	9	4
National U. of Singapore	9	9	U. do Vale do Itajai	16	7	National Chemical Laboratory India	9	4
Institut de Chimie des Substances Naturelles	9	6	U. Nacional Autonoma de México	13	6	Central Queensland	9	3
University of Peradeniya	8	10	U. Federal de Mato Grosso	13	5	U. Putra Malaysia	7	4

The indicators used are: number of publications (*P*); and Hirsch index (*h*)

(Yale University) is the leader on research on *C. brasiliense*, she posses several studies on ecological applications for this species; nevertheless, does not possess to many co-authorship relations (Fig. 2). Finally, Masjuki H.H (U. of Malaya) is the leader on *C. inophyllum* publications (Table 2) and one of the main coauthors in this topic (Fig. 2), he has focused mainly on biodiesel applications of this species.

As seen in Fig. 3 the main biological research over the last years in *C. brasiliense* have been focused on its enviromental and ecological applications; for instance, it has been proposed the development of a phytomedicine (a extract from the leaves containing anti-HIV coumarins) as a strategy to impulse sustainable plantations, contributing to stop deforestation (César et al. 2011; Tapia-Tapia and Reyes-Chilpa 2008). Even so, there is an important amount of papers for anti-parasitic activities, mostly related to mammea type coumarins, antileishmania (Brenzan et al. 2007); and trypanocidal (Reyes-Chilpa et al. 2008), as well as for cytotoxic properties specially against leukemia cell lines such as K562 and HL-60 (Ito et al. 2006; Gomez-Verjan et al. 2014; Kimura et al. 2005), and antimicrobial properties mostly related to inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* (Pires et al. 2014) and *Helicobacter pylori* (Su et al. 2008). This highlight *C. brasiliense* as a potential source of natural products, particulary mammea type coumarins with potential for the development of new drugs with antiparasite properties, and against leukemia.

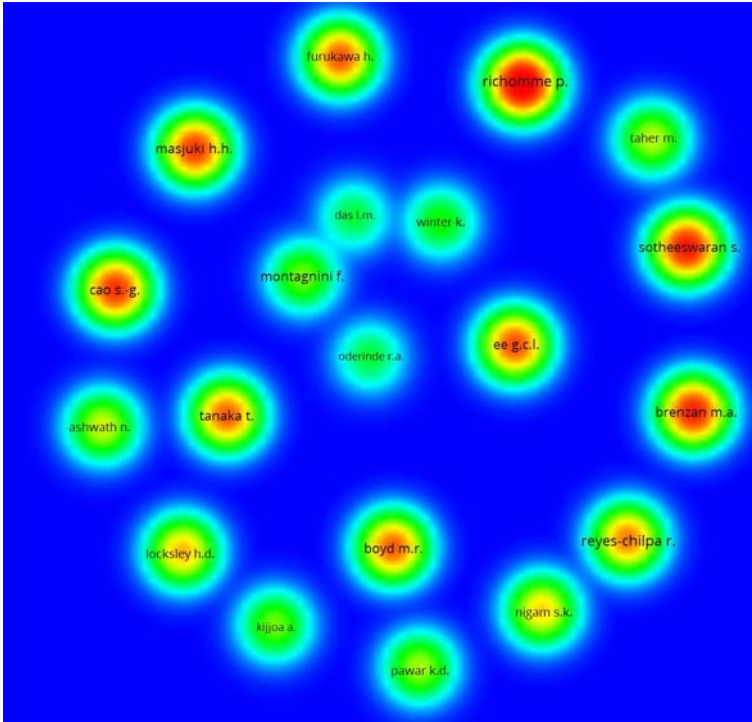


Fig. 2 Main authors with more than 5 co-authorship research publications on *Calophyllum* genus, the density (size and red color) accordingly to co-authorship importance (number of coauthorships). (Color figure online)

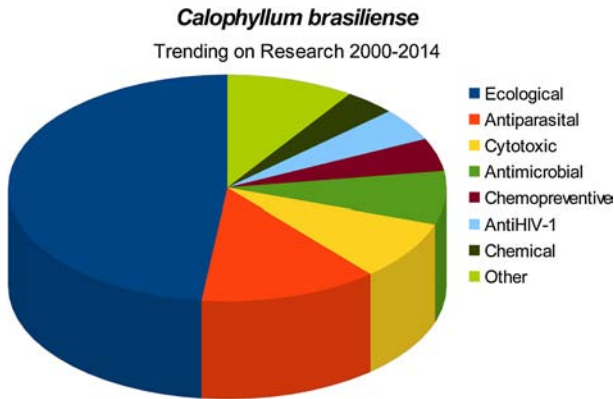


Fig. 3 Biological and pharmacological activities tested on *C. brasiliense*. Other: analgesic, relaxant, moluscicidal, immunomodulatory, antiulceral, inhibitors of SULT1A1, SULT1A2, ACE, H+K+ ATPase

Calophyllum inophyllum has a higher number of publications (147) and different categories of research as compared to *C. brasiliense* (Fig. 4). The biotechnological applications have been the most studied topic on this species compared to its pharmacological

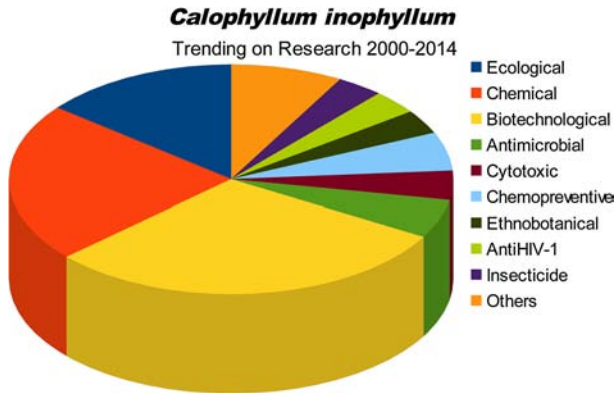


Fig. 4 Pharmacological and Biological activities of *C. inophyllum*. Others: clinical use report, ocular burn healing, analgesic, anti-platelet, anti-hypertension, anti-inflammatory, anxiolytic, inhibitor (PAF, XAO)

activities, since there are more than 40 papers on the non-edible oil from its seeds. “Honne oil” is a 2nd generation source of biodiesel. The annual yield of a mature tree is about 100 kg of seeds, which produce approximately 18 kg of oil (Rizwanul Fattah et al. 2014); once, it has been de-gummed and neutralized its capacities as a biofuel are improved (Ong et al. 2014). It has been proved that *C. inophyllum* biodiesel blends can be used effectively in a diesel engine without modification (Rizwanul Fattah et al. 2014). There are also an important amount of papers dedicated uniquely to the isolation of new and majoritarian compounds, such as coumarins (tetracyclic, tricyclic, and mammea type) and xanthenes, some of them restricted to this species. Interestingly, *C. inophyllum* coumarins possess interesting activities as chemopreventive agent against Eipstein Barr Virus; while some xanthenes have antimicrobial properties.

The text mining analysis performed with Arrowsmith software (that uses the MEDLINE database) showed a higher correlation (0.99–0.98) between the topics *Calophyllum* spp. AND Research with the terms RT-HIV-1, biodiesel production, biohydrogen, biosorption, *Rhodobacter sphaeroide*, *Enterobacter aerogenes*, antibacterial, antifungal, antileishmanial, coumarins, and xanthenes. The terms: antimicrobial activity, antibacterial activity, antileishmanial, K562, antiproliferative, and *Mycobacterium tuberculosis* correlated (0.99–0.96) with *C. brasiliense* and Research. The terms HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, biodiesel, biohydrogen correlated (0.99–0.96) with *C. inophyllum* and Research, since one of the trending topics over the last years on this species is the obtention of non-edible oil from the seeds for the production of 2nd generation biodiesel. Correlation with *R. sphaeroide* and *E. aerogenes* is related to the fact that a two-step biodiesel production method has been proposed with these bacteria (Venkanna and Reddy 2009; Arumugam et al. 2014).

The text mining analysis indicated that the most interesting secondary metabolites isolated from *C. brasiliense* are coumarins and xanthenes, responsible for its activity against RT-HIV-1, antimicrobial and antiparasital properties. For example, calanolide A, and soulatrolide, have been proposed as a dual agents against *M. tuberculosis* and HIV-1, the former is an opportunistic microorganism associated with AIDS (Pires et al. 2014; Xu et al. 2004; Huerta-Reyes et al. 2004). The relationship between *Calophyllum* spp. and the term Cancer showed correlation (0.99–0.96) with the terms HL-60, selective COX-2 inhibitor, coumarins, apoptosis inductor, raw 264 cells, K562 cells. Moreover, there is a

strong relationship between leukemia cell lines and mammae type coumarins, since these have shown the induction of cell death by apoptosis tested against several types of leukemia cell lines such as K562 and HL-60 (Ito et al. 2006; Gomez-Verjan et al. 2014).

Conclusions

Pharmacological and biological research on *Calophyllum* spp. has been increasing over the last years (1994 to date), due to its potential as an important source of pharmacologically active compounds against HIV-1, intracellular parasites, cancer cell lines, especially leukemia, among others. In addition, *C. inophyllum* has shown potential as source of oil for 2nd generation biodiesel. Further studies should focus on toxicological research in order to validate if active secondary metabolites (xanthenes and coumarins) have real opportunities for the development of new active drugs or that extracts could be developed as phyto-medicines. Medicinal and industrial applications of the main species *C. brasiliense*, and *C. inophyllum* could also impulse sustainable forest plantations.

Experimental section

We use Scopus database which covers an expanded spectrum of journals and a faster citation analysis (Falagas et al. 2008). Searches for publications on *Calophyllum*, *C. brasiliense* and *C. inophyllum* were performed for the period 1900–2014 using the search statement:

“Topic” = (*Calophyllum*) AND [EXCLUDE(DOCTYPE, “er” OR EXCLUDE (DOCTYPE, “no”) (*C. brasiliense*)] AND [EXCLUDE(DOCTYPE, “er” OR EXCLUDE (DOCTYPE, “no”), *C. inophyllum*)] AND [EXCLUDE(DOCTYPE, “er” OR EXCLUDE (DOCTYPE, “no”)], respectively. “Topic” refers to ALL FIELD.

Scientometric indicators

We used bibliometric indicators described in the literature for bibliometric studies (Li and Willett 2010); number of publications (P), number of citations (© mean number of citations per publication (CPP), percentage of publications not cited (PNC), percentage of reviews (PR) and Hirsch index (h).

Scientometric cluster analysis (more than 5 co-authorship publications), density (number of co-authorship publications) and network (authors related in the co-authorship clusters) were built with freely available software VOSviewer version 1.6.0 (Van Eck and Waltman 2010).

For trending topics on *Calophyllum* research we performed text mining analysis with free on line software Arrowsmith (Smalheiser et al. 2009), which identify meaningful links between two sets of Medline articles, a UIC-based site for searching links between two literatures within Medline, we search for the intersection (B-list) of *Calophyllum* AND research (Job ID: 196081), *C. brasiliense* AND research (Job ID: 19981), *C. inophyllum* AND research (Job ID:20010), *Calophyllum* AND Cancer (Job ID:20039), *Calophyllum* AND biodiesel (Job ID:20184). All other graphs were made by GraphPad Prism 5 statistical software.

Acknowledgments Juan Carlos Gomez Verjan is grateful with Posgrado en Ciencias Biomédicas-UNAM and CONACyT for providing a scholarship number 220346. This work was submitted in fulfillment of the requirements to obtain PhD degree at Doctorado en Ciencias Biomédicas and Universidad Nacional Autónoma de México. This research was supported by Grant IG200513 from DGAPA-UNAM. I. Gonzalez-Sanchez was supported by a post-doctoral Grant (DGAPA-UNAM).

References

- Arumugam, A., Sandhya, M., & Ponnusami, V. (2014). Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake. *Bioresource Technology*, *164*, 170–176.
- Atabani, A. E., & César, A. D. S. (2014). *Calophyllum inophyllum* L.—A prospective non-edible biodiesel feedstock. study of biodiesel production, properties, fatty acid composition, blending and engine performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *37*, 644–655.
- Brenzan, M. A., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Ueda-Nakamura, T., Young, M. C. M., Córrea, A. G., et al. (2008). Structure–activity relationship of (–) mamea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *62*, 651–658.
- Brenzan, M. A., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Ueda-Nakamura, T., Young, M., & Cortez, D. A. G. (2007). Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, *101*, 715–722.
- Brenzan, M. A., Santos, A. O., Nakamura, C. V., Filho, B. P. D., Ueda-Nakamura, T., Young, M. C. M., et al. (2012). Effects of (–) mamea A/BB Isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *19*, 223–230.
- Butler, M. S. (2005). Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports*, *22*, 162–195.
- Butler, M. S., Robertson, A. A. B., & Cooper, M. A. (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural Products Reports*, *31*, 1612–1661.
- César, G. Z. J., Alfonso, M. G. G., Marius, M. M., Elizabeth, E.-M., Ángel, C. B. M., Maira, H.-R., et al. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia*, *82*, 1027–1034.
- Creagh, T., Ruckle, J. L., Tolbert, D. T., Giltner, J., Eiznhamer, D. A., Dutta, B., et al. (2001). Safety and Pharmacokinetics of Single Doses of (+)-Calanolide A, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*, 1379–1386.
- Cusack, D., & Montagnini, F. (2004). The role of native species plantations in recovery of understory woody diversity in degraded pasturelands of Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, *188*, 1–15.
- Da Silva, K. L., dos Santos, A. R., Mattos, P. E., Yunes, R. A., Delle-Monache, F., & Cechinel-Filho, V. (2001). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie*, *56*, 431–434.
- Do Carmo Souza, M., Beserra, A. M. S., Martins, D. C., Real, V. V., dos Santos, R. A. N., Rao, V. S., et al. (2009). In vitro and in vivo anti-helicobacter pylori activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology*, *123*, 452–458.
- Falagas, M. E., Pitsouni, E. I., Malietzis, G. A., & Pappas, G. (2008). Comparison of PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar: Strengths and weaknesses. *FASEB Journal*, *22*, 338–342.
- Filho, V., Meyre-Silva, C., & Niero, R. (2009). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, *6*, 313–327.
- García-Barriga, H. (1992). *Flora Medicinal de Colombia*. *Botanica Medica* (Vol. 2). Bogota: Tercer Mundo Editores.
- Gomez-Verjan, J. C., Estrella-Parra, E. A., González-Sánchez, I., Vázquez-Martínez, E. R., Vergara-Castañeda, E., Cerbón, M. A., & Reyes-Chilpa, R. (2014). Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *66*, 1189–1195.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M. D. C., Abe, F., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., & Reyes-Chilpa, R. (2004). HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*, 1471–1475.

- Isaias, D. E., Niero, R., Noldin, V. F., de Campos-Buzzi, F., Yunes, R. A., Delle-Monache, F., & Cechinel-Filho, V. (2004). Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie*, *59*, 879–881.
- Ito, C., Murata, T., Itoigawa, M., Nakao, K., Kaneda, N., & Furukawa, H. (2006). Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *58*, 975–980.
- Jantan, I., Juriyati, J., & Warif, N. A. (2001). Inhibitory effects of xanthenes on platelet activating factor receptor binding in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, *75*, 287–290.
- Kashman, Y., Gustafson, K. R., Fuller, R. W., Cardellina, J. H., McMahon, J. B., Currens, M. J., et al. (1992). The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum Lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, *35*, 2735–2743.
- Kimura, S., Ito, C., Jyoko, N., Segawa, H., Kuroda, J., Okada, M., et al. (2005). Inhibition of Leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *International Journal of Cancer*, *113*, 158–165.
- Laure, F., Herbette, G., Faure, R., Bianchini, J. P., Raharivelomanana, P., & Fogliani, B. (2005). Structures of new secofriedelane and friedelane acids from *Calophyllum inophyllum* of French Polynesia. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *43*, 65–68.
- Li, J., & Willett, P. (2010). Bibliometric analysis of chinese research on cyclization, MALDI-TOF and antibiotics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *50*, 22–29.
- Ong, H. C., Masjuki, H. H., Mahlia, T. M. I., Silitonga, A. S., Chong, W. T., & Leong, K. Y. (2014). Optimization of biodiesel production and engine performance from high free fatty acid *Calophyllum inophyllum* oil in CI diesel engine. *Energy Conversion and Management*, *81*, 30–40.
- Patil, A. D., Freyer, A. J., Eggleston, D. S., Haltiwanger, R. C., Bean, M. F., Taylor, P. B., et al. (1993). The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of Medicinal Chemistry*, *36*, 4131–4138.
- Pires, C. T. A. T., Brenzan, M. A., Scodro, R. B. D. L., Cortez, D. A. G., Lopes, L. D. G., Siqueira, V. L. D., & Cardoso, R. F. F. (2014). Anti-mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *109*, 324–329.
- Potti, G. R., & Kurup, P. A. (1970). Antibacterial principle of the root bark of *Calophyllum inophyllum*: Isolation and antibacterial activity. *Indian Journal of Experimental Biology*, *8*, 39–40.
- Rafols, I., Hopkins, M. M., Hoekman, J., Siepel, J., O'Hare, A., Perianes-Rodríguez, A., & Nightingale, P. (2014). Big pharma, little science? *Technological Forecasting and Social Change*, *81*, 22–38.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Apan, T. R. R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C. K., & Vázquez-Torres, M. (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences*, *75*, 1635–1647.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., & Hernández-Ortega, S. (2008). Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(5), 431–436.
- Rizwanul Fattah, I. M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Wakil, M. A., Ashraf, A. M., & Shahir, S. A. (2014). Experimental investigation of performance and regulated emissions of a diesel engine with *Calophyllum inophyllum* biodiesel blends accompanied by oxidation inhibitors. *Energy Conversion and Management*, *83*, 232–240.
- Saklani, A., & Kutty, S. K. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, *13*, 161–171.
- Sanjid, A., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Rahman, S. M. A., Abedin, M. J., & Palash, S. M. (2013). Impact of palm, mustard, waste cooking oil and *Calophyllum inophyllum* biofuels on performance and emission of CI engine. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 664–682.
- Smalheiser, N. R., Torvik, V. I., & Zhou, W. (2009). Arrowsmith two-node search interface: A tutorial on finding meaningful links between two disparate sets of articles in MEDLINE. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, *94*, 190–197.
- Stevens, P. F. (1980). A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of Arnold Arboretum*, *61*, 117–699.
- Su, X.-H. H., Zhang, M.-L. L., Li, L.-G. G., Huo, C.-H. H., Gu, Y.-C. C., & Shi, Q.-W. W. (2008). Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, *5*, 2579–2608.
- Tapia Tapia, E. C., & Reyes Chilpa, R. (2008). Productos Forestales No Maderables En México : Aspectos Económicos Para El Desarrollo Sustentable Mexican non-wood forest products: Economic aspects for sustainable development. *Maderas y Bosques*, *14*, 95–112.
- Van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, *84*, 523–538.

- Venkanna, B. K., & Reddy, C. V. (2009). Biodiesel production and optimization from *Calophyllum inophyllum* linn oil (honne oil)—A three stage method. *Bioresource Technology*, *100*, 5122–5125.
- Xu, Z.-Q., Barrow, W. W., Suling, W. J., Westbrook, L., Barrow, E., Lin, Y.-M., & Flavin, M. T. (2004). Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *12*, 1199–1207.
- Zavaleta-Mancera, H., Reyes-Chilpa, R., & García-Zebadua, J. (2011). Leaf structure of two chemotypes of *Calophyllum brasiliense* from Mexico. *Microscopy and Microanalysis*, *17*, 340–341.
- Zhu, X.-F., Hao, J.-F., & Xin, L. (2013). Scientific publications in obstetrics and gynecology journals from China, 2000–2009. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, *123*, 96–100.